

**Das multifunktionelle Signalprotein Topoisomerase
II β -Bindepotein 1 (TopBP1) und seine Funktion in
der DNA-Schadenserkennung und Replikation**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Uta Schmidt
geboren am 21.03.1975 in Erfurt

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Wissenschaftliche Beiträge	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das multifunktionelle Signalprotein Topoisomerase II β -Bindepotein 1 (TopBP1)	3
1.1.1 TopBP1 und Replikation	3
1.1.1.1 Cdc45 (<i>Cell division cycle protein 45</i>)	5
1.1.2 TopBP1 und DNA-Reparatur	6
1.1.2.1 PARP-1 (Poly(ADP-ribose)polymerase)	7
1.1.3 TopBP1, Transkription und Krebsentstehung	8
1.2 Vorangegangene Arbeiten	10
1.2.1. <i>In vitro</i> Interaktion von TopBP1 und PARP-1	10
1.2.2. <i>In vivo</i> Interaktionen von TopBP1 und PARP-1	11
1.2.3. Koloalisation von TopBP1 und PARP-1 in den Kernen von HeLa-Zellen	12
1.2.4. PARP-1 ADP-ribosyliert TopBP-BRCT6	12
1.2.5. Funktionelle Aspekte der ADP-Ribosylierung des Proteins TopBP1	12
1.2.6. <i>In vivo</i> Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45	14
1.2.7. <i>In vitro</i> Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45	15
1.4 Zielstellung dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Allgemeines	17
2.2 Material	
2.2.1 Stämme und Zelllinien	17
2.2.2 Vektoren und Plasmide	17
2.2.3 Klonierungsprimer	19
2.2.4 Medien	19
2.2.4.1 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien	19
2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen	20
2.2.5 Stammlösungen	20
2.2.6 Puffer	21

2.2.7 Chemikalien	22
2.2.8 Größenstandards	23
2.2.9 Enzyme	23
2.2.10 Filme, Filter und Geräte	24
2.2.11 Antikörper	25
2.2.11.1 Primärantikörper	25
2.2.11.2 Sekundärantikörper	26
2.2.12 Kits	26
2.3 Methoden	26
2.3.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> nach Hanahan (1983)	26
2.3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	26
2.3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien	27
2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	27
2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Midi- und Maxipräparation)	27
2.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA	27
2.3.5 Bearbeitung von Plasmid-DNA	28
2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.3.7 Zielgerichtete Mutagenese	28
2.3.8 Zellkultur eukaryotischer Zellen	28
2.3.9 Transfektion eukaryotischer Zellen	29
2.3.9.1 Transfektion mit FuGene HD von Roche	29
2.3.10 Plasmidkonstruktion	29
2.3.11 <i>Mammalian-one-hybrid</i> - und Luziferase-Assays	30
2.3.12 Indirekte Immunfluoreszenz	30
2.3.13 Synchronisierung von HeLa-S3-Zellen	31
2.3.13.1 Synchronisierung von HeLa-S3-Zellen mittels Thymidin bzw. Mimosin	31
2.3.13.2 Synchronisierung mit Mimosin	32
2.3.14 Durchflusszytometrie (Ormerod, 1994)	32
2.3.15 <i>Yeast-one-hybrid</i> -Assay	33
2.3.16 Analyse und Expression von Proteinen	33
2.3.16.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)	33
2.3.16.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
2.3.16.3 Western Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	34
2.3.16.4 <i>Stripping</i> von Nitrocellulosemembranen	34

2.3.16.5 Coimmunopräzipitationsexperimente	34
2.3.16.6 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen und deren Aufreinigung	35
2.3.16.7 <i>In vitro</i> Expression von Proteinen	35
2.3.16.8 GST-Pull-down- und andere <i>in vitro</i> Interaktionsexperimente	35
2.3.16.9 <i>In vitro</i> Poly(ADP-ribosyl)ierung modifiziert nach Ferro & Olivera (1982) und deren Hemmung	36
2.3.16.10 Zellfraktionierung und Chromatin-Isolation (nach Mendez und Stillman, 2000)	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Das Topoisomerase II β Bindeprotein 1 (TopBP1) interagiert mit der Poly(ADP- Ribosyl)Polymerase (PARP-1)	38
3.1.2 PARP-1 interagiert mit der 6.BRCT-Domäne von TopBP1 <i>in vitro</i>	38
3.1.3 PARP-1 und TopBP1 interagieren <i>in vivo</i>	39
3.1.4 Die zelluläre Verteilung von PARP-1 und TopBP1 in HeLa-S3-Zellen	41
3.1.5 TopBP1 wird von PARP-1 ADP-ribosyliert	43
3.1.6 Die zelluläre Poly(ADP-ribosyl)ierungsaktivität verhindert die Bindung von TopBP1 an Miz1	45
3.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem humanen Topoisomerase II β - Bindeprotein (TopBP1) und dem <i>Cell division cycle protein 45</i> (Cdc45)	47
3.2.1 TopBP1 und Cdc45 interagieren <i>in vivo</i> ausschließlich am G1/S-Übergang des Zellzyklus	48
3.2.2 TopBP1 und Cdc45 interagieren <i>in vitro</i>	53
3.2.3 Cdc45 interagiert <i>in vitro</i> mit der 1. und 2. BRCT-Domäne ebenso wie mit der 6. BRCT-Domäne	54
3.2.4 Cdc45 hemmt die Transkriptionsaktivität von TopBP1 in Hefe- und Säugerzellen	56
3.2.5 Die Überexpression der 6.BRCT-Domäne in HeLa-Zellen führt zur verminderten Bindung von Cdc45 an das Chromatin	58
3.3 Eine Mutation innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 führt zum Absinken der Transaktivierungsaktivität	61

4. Diskussion	64
4.1 TopBP1 interagiert mit PARP-1	64
4.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45	66
4.3 Eine Mutation innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 führt zum Absinken der Transaktivierungsaktivität	71
4.4 Ausblick	77
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
Selbstständigkeitserklärung	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
AD	-	Automodifikationsdomäne
ADP	-	Adenosindiphosphat
AIF	-	<i>apoptosis inducing factor</i>
aa	-	<i>amino acid</i>
AS	-	Aminosäure
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i> (kommerzielle Zell- und Gewebekbank)
ATM	-	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
ADP	-	Adenosindiphosphat
ATR	-	<i>ATM related</i>
bp	-	Basenpaare
BRCA1	-	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BRCT	-	BRCA1 Carboxy-Terminus
BSA	-	Bovines Serumalbumin
Cdc45	-	<i>cell division cycle protein 45</i>
Cdk	-	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	-	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CTP	-	Cytidintriphosphat
ctr.	-	<i>control</i> (Kontrolle)
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DBD	-	DNA-Bindedomäne
DDK	-	<i>Dbf4-dependent kinases</i> (Dbf4-abhängige Kinasen)
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ds	-	<i>double strand</i> (Doppelstrang)
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
dNDP	-	Desoxynukleosiddiphosphat
DSB	-	Doppelstrangbrüche
DTT	-	Dithiothreitol

ECL	-	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EGTA	-	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N´N´-tetraessigsäure
FACS	-	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	-	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
GINS	-	<i>go ichi ni san</i>
GTP	-	Guanosintriphosphat
GST	-	Glutathion S-Transferase
HPV	-	Humane Papillomaviren
HRP	-	<i>horse-radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
hHYD	-	<i>human hyperplastic discs</i>
IB	-	Immunoblot
IC	-	Initiationskomplex
IF	-	Immunofluoreszenz
IP	-	Immunopräzipitation
IPTG	-	Isopropylthio- β -D-galactosid
IVT	-	<i>in vitro</i> Translation/Translatat
kDa	-	Kilodalton
Mcl-1	-	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MCM	-	<i>minichromosome maintenance</i>
Miz1	-	<i>Myc-interacting zinc finger protein 1</i>
MOPS	-	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	-	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NAD	-	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
nt	-	Nukleotide
OD	-	optische Dichte
ORC	-	<i>origin recognition complex</i>
PAGE	-	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	-	Poly(ADP-Ribose)
PARP	-	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	-	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	-	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	-	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)

PI3-Kinase	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLM	-	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol α /Prim	-	DNA-Polymerase α /Primase
Pol δ	-	DNA-Polymerase δ
Pol ϵ	-	DNA-Polymerase ϵ
pre-RC	-	<i>pre-replication complex</i> (präreplikativer Komplex)
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid
Rb	-	Retinoblastoma
RISC	-	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	-	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	-	RNA Interferenz
RPA	-	<i>replication protein 1</i>
rpm	-	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRX	-	RhodaminX
RT	-	Raumtemperatur
RT-PCR	-	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	-	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	-	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	-	<i>single strand</i> (Einzelstrang)
Tab.	-	Tabelle
TBS	-	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCF-4	-	<i>T-cell factor</i>
TdR	-	Thymidin
TEMED	-	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	-	<i>tumor growth factor-β</i>
TopBP1	-	Topoisomerase II β -Bindeprotein 1
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	-	Thymidintriphosphat
U	-	<i>unit</i> (Einheit)
UV	-	ultraviolett
WB	-	Western Blot
XRCC1	-	<i>X-ray repair cross-complementing 1</i>

Yvonne Wollmann*, **Uta Schmidt***, **Gerhard D. Wieland**, **Peter F. Zipfel**, **Hans-Peter Saluz** and **Frank Hänel** (2007) The DNA Topoisomerase II β Binding Protein 1 (TopBP1) Interacts with Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP-1)
Journal of Cellular Biochemistry 102:171–182

Uta Schmidt, **Yvonne Wollmann**, **Claudia Franke**, **Frank Grosse**, **Hans-Peter Saluz** and **Frank Hänel** (2008) Characterization of the interaction between the human DNA topoisomerase II β binding protein 1 (TopBP1) and the cell division cycle protein 45 (CDC45)
Biochemical Journal 2008 Jan 1; 409(1):169-77

* gleichberechtigte Erstautoren

Posterpräsentation: 2. Internationaler Kongress des SFB604 „Signaling complexes“ 09/2007

1. Einleitung

Die Zellteilung ist die Grundlage für die Vervielfältigung, Differenzierung, Entwicklung und das Überleben von eukaryotischen Organismen. So finden im menschlichen Organismus mehrere Millionen Zellteilungen pro Sekunde statt. Diese außerordentliche Anzahl veranschaulicht, wie wichtig es für den Organismus ist, dass diese Zellteilungen korrekt ablaufen. Zunächst einmal muss das Genom und damit die gesamte genetische Information verdoppelt werden, um beiden Tochterzellen den vollständigen Satz aller Gene zur Verfügung zu stellen. Weiterhin müssen die Zellen vor der Teilung ihre Zellmasse und -organellen verdoppeln. Nicht nur im Zuge der Reproduktion, auch im Verlauf des Wachstums muss die zeitliche Abfolge der verschiedenen Prozesse durch den sogenannten Zellzyklus koordiniert werden.

Während der ersten Wachstumsphase, der G1-Phase, findet in Vorbereitung auf die folgende Teilungsphase das Wachstum der Zellen statt. In der anschließenden Synthese (S)-Phase wird die DNA verdoppelt. Vor der eigentlichen Zellteilungsphase, der Mitose (M)-Phase erfolgt eine zweite Wachstumsphase, die G2-Phase. G1-, S- und G2-Phase werden auch als Interphase, als Periode zwischen den Zellteilungen, zusammengefasst (Abb.1). Ein Ausstieg aus dem Zellzyklus kann hauptsächlich auf zwei Wegen erfolgen. In die sogenannte G0-Phase gelangen Zellen, die nicht mehr teilungsfähig sind. Sollten diese Zellen nicht mehr benötigt werden oder aber sehr fehlerhaft sein, folgt die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod. Ein sehr wichtiger Prozess, denn er führt nicht nur zur Differenzierung von Organismen, sondern auch zu einer Reduktion entarteter Zellen und damit zur Minderung von Krebs. Da der korrekte Ablauf des Zellzyklus so entscheidend für das gesunde Überleben der Organismus ist, werden die Übergänge in die jeweils nächste Phase des Zellzyklus streng kontrolliert. Jede der Phasen muss erfolgreich beendet sein, bevor der Eintritt in die nächste Phase erfolgen kann (Hartwell & Weinert, Science 1989).

An diesen Kontrollpunkten (*checkpoints*) wirken bestimmte Proteine, wie beispielsweise CDKs (Cyclin-abhängige Kinasen), die über Komplexbildung mit Cyclinen aktiviert werden und im Anschluss ihre Substratproteine, z.B. Proteine der Rb (Retinoblastom)-Familie phosphorylieren (Grana & Reddy, 1995; Lees, 1995; Howard *et al.*, 2000; DeGregori, 2004).

Am Ende der G1-Phase liegt ein besonderer *checkpoint*. Wird dieser G1-Kontrollpunkt überschritten, verdoppelt sich die DNA und die anschließende Zellteilung findet statt („Alles-oder-Nichts“-Entscheidung). Andererseits kann die Zelle hier den Zellzyklus verlassen und in die G0-Phase eintreten. Die meisten menschlichen Zellen sind in der G0-Phase arretiert. Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt liegt vor dem Eintritt in die Mitose am Ende der G2-Phase.

Hier wird geprüft, ob die DNA-Replikation vollständig ablief, DNA-Schäden vorhanden sind und die Zelle groß genug für die Teilung ist. Am Metaphase-Kontrollpunkt wird die Trennung der Chromatiden in der Anaphase so lange verhindert bis alle Zentromere (Kinetochore) mit den Fasern des Spindelapparates verknüpft und die Chromosomen in der Äquatorialebene nebeneinander angeordnet sind.

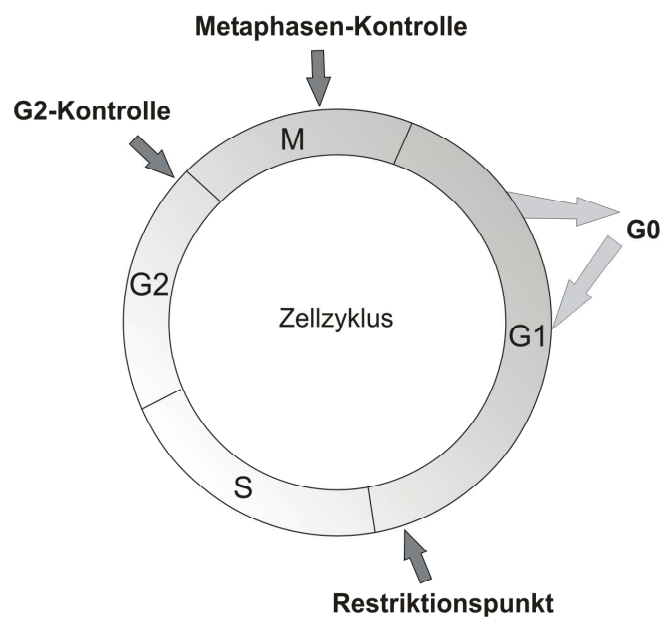


Abb.1 Darstellung der verschiedenen Zellzyklusphasen G1-, S-, G2-, M-Phase und der wichtigsten Kontrollpunkte (*checkpoints*)

Neben den intrinsischen Kontrollmechanismen sichern extrinsische Einflüsse, wie Wachstumsfaktoren, die optimale Entwicklung des Organismus. Da Zellen einer steten Exposition bestimmter Faktoren (physikalischer oder chemischer Natur) unterliegen, die Schädigungen des genetischen Materials hervorrufen, muss eine dauerhafte Kontrolle erfolgen. Werden Schäden von den *checkpoint*-Kontrolleinrichtungen erkannt, werden Schadenssignale über meist sehr konservierte Signalwege an unterschiedliche zelluläre Systeme weitergegeben. Der Fortlauf des Zellzyklus ist vom Ausmaß der DNA-Schädigung abhängig. Sind die Schäden irreparabel, so wird der programmierte Zelltod eingeleitet, anderenfalls kann der Zellzyklus nach erfolgter DNA-Reparatur, verzögert fortgesetzt werden. Mit Hilfe der *checkpoints* werden also Schädigungen der DNA behoben und somit Fehler im genetischen Code verhindert. Folglich führen Störungen dieser Kontrollmechanismen zu genetischen Veränderungen (Mutationen), die wiederum zur Krebsentstehung beitragen können. Um therapeutische Strategien diesbezüglich entwickeln zu können, ist es wesentlich,

die komplexen Netzwerke von Signalwegen und zellulären Systemen, in denen verschiedene Proteine zahlreich zusammenwirken, aufzuklären.

1.1 Das multifunktionelle Signalprotein Topoisomerase II β Bindeprotein 1 (TopBP1)

1.1.1 TopBP1 und Replikation

TopBP1 wurde zuerst als DNA-Topoisomerase II β -interagierendes Protein identifiziert (Yamane et al., 1997). Humanes TopBP1 besitzt acht BRCA1-carboxylterminale (BRCT) Domänen, ein Motiv, dass zuerst im *BRCA1* (*breast cancer gene 1*)-Genprodukt (Koonin et al., 1996) und in Folge in einigen Proteinen, die in engem Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle und DNA-Schadensantwort stehen, beschrieben wurde (Bork et al., 1997, Callebaut & Mornon, 1997). BRCT-Domänen bestehen in der Regel aus 80 bis 100 Aminosäuren und treten oft als Tandemstrukturen auf. Durch Cluster konservierter hydrophober Aminosäuren wird das Motiv definiert. Durch die Röntgenstrukturanalyse der C-terminalen BRCT-Domäne von XRCC1 konnte deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden (Zhang et al., 1998). Es handelt sich um vier parallele β -Faltblattstrukturen als Kern, welcher von drei α -Helices umgeben ist. Die beschriebenen BRCT-Domänen sind in der Lage, Interaktionen zwischen Proteinen zu vermitteln (Huyton et al., 2000). Dabei werden Phosphopeptide erkannt. BRCT-Domänen können den Phosphorylierungsstatus ihrer Interaktionspartner unterscheiden (Yu et al., 2003, Manke et al., 2003, Rodriguez et al., 2003). TopBP1 ist in der Lage mit verschiedenen Proteinen, wie dem HPV16 (*human papilloma virus type 16*), dem Transkriptions-/Replikations-Faktor E2 (Boner et al., 2002), der DNA-Polymerase ϵ , hRad9 (Mäkinen et al., 2001), Miz1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) (Herold et al., 2002), E2F-1 (Liu et al., 2003), dem Homologen zum E6-assoziierten Protein (E6AP), der Ligase hHYD (*human hyperplastic discs*) (Honda et al., 2002) und PML (*promyelocytic leukemia protein*) (Xu et al., 2003) zu interagieren.

TopBP1-Homologe wurden in *Saccharomyces cerevisiae* (Dbp11), *Schizosaccharomyces pombe* (Rad4/Cut5), *Drosophila melanogaster* (*Mutagensensitive-101* (Mus101) und *Xenopus laevis* (Xmus 101/Cut5) gefunden (Abb.2).

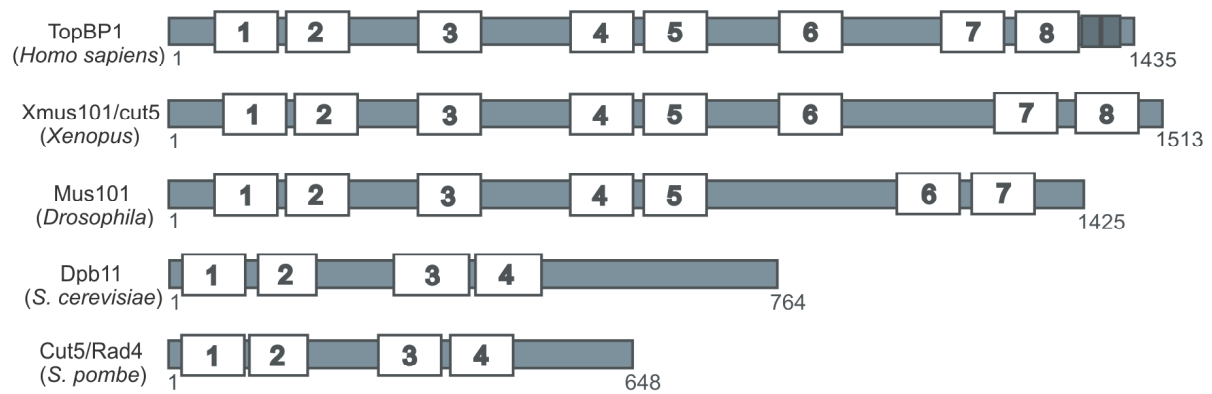


Abb.2: Schematische Darstellung von TopBP1, Xmus101/cut5, Mus101, Dpb11, Cut5/Rad4

Ebenso wie das Hefe-Homologe spielt auch humanes TopBP1 eine Rolle für das Überleben der Zellen, die DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle. In der Literatur ist weiterhin eine Funktion als transkriptioneller Regulator beschrieben (Garcia *et al.*, 2005). Als Antwort auf UV-Strahlung wird TopBP1 von ATM (*Ataxiatelangiectasia mutated kinase*) phosphoryliert (Yamane *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2007), ein Hinweis auf die Rolle von TopBP1 in der DNA-Schadenkontrolle.

Diese Rolle wurde in einer Studie mittels Antisense-Oligonukleotiden dargestellt, in der gezeigt wurde, dass der durch UV-Strahlung induzierte G2/M-Übergang und die Chk1 (*checkpoint kinase 1*)-Phosphorylierung in Abwesenheit von TopBP1 teilweise aufgehoben wurden (Yamane *et al.*, 2003). In einer unlängst erschienenen Arbeit wurde die Interaktion von TopBP1 mit ATM und dem Rad3-related (ATR)-Genprodukt und die immense Verstärkung der ATR-Kinase-Aktivität belegt (Kumagai *et al.*, 2006). Obwohl bekannt ist, dass TopBP1 in die DNA-Schadenskontrolle involviert ist, ist seine Rolle in der Replikation oder im S-Phasenverlauf humaner Zellen relativ unbekannt.

Dass ein Anstieg des Proteins TopBP1 während der S-Phase (Yamane *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004) gefunden wurde, weist auf eine Beteiligung in der Replikation hin. Die Neutralisation von TopBP1 mittels polyklonalem Antiserum gegen die 6. BRCT-Domäne verursacht *in vitro* eine Hemmung der replikativen DNA-Synthese in HeLa-Zellkernen (Mäkinen *et al.*, 2001). Die Replikation konnte noch effektiver durch das rekombinante Proteinfsegment gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die 6. BRCT-Domäne essentiell für die Replikationsaktivität ist, möglicherweise durch die Interaktion mit einem Replikationsfaktor (Mäkinen *et al.*, 2001). Die Interaktion zwischen TopBP1 und der DNA-Polymerase ϵ , beschrieben von denselben Autoren, lässt ebenfalls eine Teilnahme von TopBP1 in der Replikation vermuten (Mäkinen *et al.*, 2001). Jeon und Mitarbeiter zeigten, dass humanes TopBP1 notwendig für den Übergang von der G1- zur S-Phase innerhalb des normalen

Zellzyklus ist. Ein Mangel an TopBP1 hinderte die Zellen daran, in die S-Phase einzutreten. Dies geschah durch das Herunterregulieren von p21 und p27, welches das Absinken von Cyclin E/CDK bewirkte (Jeon *et al.*, 2007).

Andere Autoren wiederum belegten, dass TopBP1 für die DNA-Replikation nicht wesentlich ist (Kim *et al.*, 2005). Sie fanden heraus, dass ein TopBP1-Mangel in Zellen, eine Erhöhung der Histon H2AX- und ATM-Chk2-Aktivierung zur Folge hat. Dies sollte durch eine Anreicherung von DNA-Doppelstrangbrüchen in Abwesenheit von TopBP1 geschehen. Brüche und Lücken an DNA-Schwachstellen, Tetraploidie (4n)-Anhäufung und abweichende Zellteilung wären die Folge. Darum postulierten Kim und Kollegen, dass die zelluläre Funktion von TopBP1 in der Überwachung der laufenden DNA-Replikation besteht (Kim *et al.*, 2005).

Die Hefezell-Proteine Rad4/Cut5/TopBP1 und Dbp11 sind essentiell für die Initiation der DNA-Replikation. Detailliertes Wissen über die Replikationsinitiation konnte mit Arbeiten in Hefezell- und *Xenopus*-Systemen erlangt werden. Während der G1-Phase bildet sich am Origin der sogenannte prä-replikative Komplex (pre-RC) aus ORC (*origin recognition complex*), Cdt1, Cdc6 und den MCM2-7 (*minichromosome maintenance proteins 2-7*).

Anschließend erfolgt die Umformung in den Initiationskomplex (IC) zu Beginn der S-Phase durch S-Phase-abhängige Kinasen (S-CDKs) und der Cdc7-Dbf4-Kinase (DDK). Dies führt zur Bindung von **Cdc45** und zur Aufwindung der DNA am Replikationsursprung (Lei & Tye, 2001).

1.1.1.1 Cdc45 (*cell division cycle protein 45*)

Erstmals wurde das Protein Cdc45 in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Moir *et al.*, 1982). Später konnten Homologe dieses Proteins auch in höheren Eukaryoten identifiziert werden.

Von Saha und Mitarbeitern wurde die zelluläre Verteilung von humanem Cdc45 (Cdc45L) über den Zellzyklus beschrieben (Saha *et al.*, 1998). Aus dieser Studie ging hervor, dass sich humanes Cdc45 zu Beginn der S-Phase im Zellkern befindet, mit fortschreitender S-Phase aus dem Zellkern ins Zytosol wandert und in der M-Phase in der gesamten Zelle verteilt vorkommt. Am G1/S-Übergang wurde eine erhöhte mRNA-Konzentration gefunden, die Proteinkonzentration blieb über den Zellzyklus hinweg gleich (Saha *et al.*, 1998).

Cdc45 ist ein essentieller Replikationsfaktor, dem eine Rolle beim Laden des DNA-Polymerase α -Primase-Komplexes (Kukimoto *et al.*, 1999) und als Prozessionsklemme für die DNA-Helikase MCM2-7 zugeschrieben wurde (Pacek & Walter, 2004; Moyer *et al.*, 2006; Pacek *et al.*, 2006).

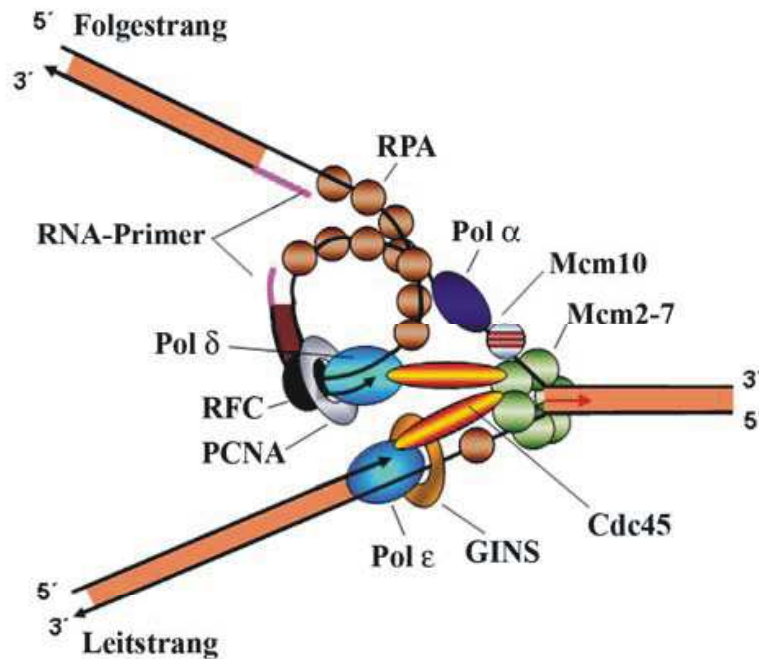


Abb.3: Cdc45 als Verbindung zwischen den DNA-Polymerasen δ und ϵ und dem Mcm2-7-Komplex

Darstellung modifiziert nach Bauerschmidt *et al.*, 2007

Außerdem könnte humanes Cdc45 eine wichtige Rolle bei der Ausdehnung der DNA-Replikation durch das Heranführen der prozessierenden DNA Polymerasen δ und ϵ an die Elongationsmaschinerie übernehmen (Bauerschmidt *et al.*, 2007) (Abb.3). In *Xenopus* ist das Xmus101/Cut5-Protein bedeutend für die Rekrutierung von Cdc45 zu den Ursprüngen der DNA-Replikation (Van Hatten *et al.*, 2002). Für die Aufklärung der physiologischen Funktionen von humanem TopBP1 während der Initiation der DNA-Replikation sollte in dieser Arbeit das Zusammenspiel von TopBP1 und Cdc45 in synchronisierten Zellen untersucht werden. Erste Hinweise auf ein solches Zusammenspiel gab es bereits in einer vorangegangenen Dissertation (Wollmann, 2005; siehe auch 1.2.6-1.2.7)

1.1.2 TopBP1 und DNA-Reparatur

Wie oben beschrieben, wurde TopBP1 von Yamane und Mitarbeitern, aufgrund der Phosphorylierung durch ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated kinase*) als Antwort auf ionisierende Strahlung, eine Funktion bei der DNA-Schadensantwort zugeordnet (Yamane *et al.*, 2002). Daneben wurde in einer Studie mittels Antisense-Oligonukleotiden demonstriert, dass der durch UV-Strahlung induzierte G2/M-Übergang und die Chk1 (*checkpoint kinase 1*)-Phosphorylierung in Abwesenheit von TopBP1 teilweise aufgehoben wurden (Yamane *et al.*,

2003). In einer weiteren Arbeit wurde die Interaktion von TopBP1 mit ATM und dem Rad3-related (ATR)-Genprodukt und die immense Verstärkung der ATR-Kinase-Aktivität belegt (Kumagai *et al.*, 2006).

Yvonne Wollmann beschrieb in ihrer Dissertation (Wollmann, 2005) die Interaktion von TopBP1 und **PARP-1**, einem DNA-Reparatur-Enzym, auf das in Folge näher eingegangen wird.

1.1.2.1 PARP-1 (Poly(ADP-ribose)polymerase)

Das DNA-Reparatur- und Protein-modifizierende Enzym PARP-1, auch als poly(ADP-ribose)synthase oder poly(ADP-ribose)transferase bezeichnet, ist ein nukleäres Protein, welches in das DNA-Basen-Exzisionsreparatursystem involviert ist. Es gehört ebenso wie PARP-2, PARP-3, PARP, Tankyrase und andere zu einer großen Superfamilie von Proteinen (Ame *et al.*, 2004). Jedes Mitglied der PARP-Familie zeigt Homologien mit der C-terminalen katalytischen Domäne von PARP-1. Die primäre Struktur von PARP-1 birgt eine N-terminale DNA-Bindedomäne, die zwei Zinkfinger-Motive enthält, eine innere Automodifikationsregion, welche eine BRCT-Domäne besitzt und eine C-terminale katalytische Domäne. PARP-1 kann eine Poly(ADP-ribosyl)ierungsreaktion katalysieren und an DNA-Strangbrüche binden. Als Antwort auf DNA-Schädigungen steigt die PARP-1-Aktivität auf das 500fache. PARP-1 transferiert 50-200 Poly(ADP-ribose)-Reste (PAR) auf sich selbst und auf Akzeptorproteine, wie Histone, Polymerasen, Transkriptionsfaktoren u.a. (Smulson *et al.*, 2000; Shall & de Murcia, 2000). Die Aktivierung von PARP-1 reguliert durch Poly(ADP-ribosyl)ierung der PARP-1-Substrate oder durch Interaktion von PARP-1 mit verschiedenen Faktoren und Enzymen, wie NF- κ B (Hassa *et al.*, 2005), AP-2 (Kannan *et al.*, 1999), B-MYB (Cervellera und Sala, 2000), E2F-1 (Simbulan-Rosenthal, 2003), YY1 (Oei & Shi, 2001), DNA-Polymerase α (Dantzer *et al.*, 1998) und Topoisomerase 1 (Yung *et al.*, 2000) die zelluläre Reparatur, DNA-Transkription und -Replikation, Zytoskelett-Organisation, Proteindegradation und andere zelluläre Aktivitäten (Bouchard *et al.*, 2003; Chiarugi *et al.*, 2002; Gagne *et al.*, 2003; Virag *et al.*, 2002).

Aminosäure-Sequenzanalysen ergaben, dass es innerhalb der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 eine strukturell ähnliche Region zur ADP(ribosyl)ierungsdomäne von Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP-1) gibt (Yamane *et al.*, 1997). *Checkpoint*-Proteine wie p35, XRCC1, NF- κ BD, welche Substrate von PARP-1 sind, wiesen andererseits ein gemeinsames Poly(ADP-Ribose)-bindenden Sequenzmotiv auf (Schmitz *et al.*, 1998, Pleschke *et al.*, 2000). Ein solches Motiv besteht typischerweise aus etwa 20 Aminosäuren. Es umfasst zwei

konservierte Bereiche. Der eine beinhaltet eine Ansammlung basischer Reste, der andere eine Folge hydrophober Aminosäuren, die von basischen Resten unterbrochen werden. Ein solches PAR-Bindemotiv befindet sich im N-terminalen Bereich der 6. BRCT-Domäne des Proteins TopBP1. Das gleichzeitige Auftreten einer Poly(ADP-ribosyl)ierungsdomäne und eines PAR-Bindemotivs innerhalb der 6. BRCT-Domäne führte zu der Hypothese, dass TopBP1 und PARP-1 miteinander interagieren könnten. Diese Interaktion wurde in der Dissertation von Y. Wollmann (Wollmann, 2005) durch Experimente belegt. Um diese Interaktion von TopBP1 und PARP-1 eingehender zu beleuchten und vor allem deren Auswirkungen auf zelluläre Prozesse aufzuklären, wurden vorangegangene Arbeiten Y. Wollmanns vertieft und entscheidend erweitert. Im Abschnitt 1.2 (Vorangegangene Studien) wird ein Überblick der zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Dissertation vorhandenen Daten gegeben.

TopBP1 übernimmt nicht nur wichtige Funktionen bei der DNA-Schadensantwort und DNA-Replikation, sondern es ist auch für das Überleben der Zellen erforderlich. Die Hemmung der TopBP1-Expression mit Antisense-Morpholino-Oligomeren oder mittels siRNAs induziert Apoptose (Yamane *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). TopBP1 ist zudem in verschiedene wichtige Aspekte der Wachstumskontrolle eingeschlossen (Garcia *et al.*, 2005).

Die Mechanismen, wie das multifunktionelle Signalprotein TopBP1 all diese Signalwege reguliert, sind noch immer nicht detailliert erforscht und verstanden.

1.1.3 TopBP1, Transkription und Krebsentstehung

Die Transkription stellt den im Zellkern von Eukaryoten stattfindenden Prozess der Synthese von RNA mittels DNA, die hierbei als Matrize dient, dar. Die entstandene RNA, die sogenannte prä-mRNA bzw. hnRNA (heterogeneous nucleus RNA) wird durch Splicing prozessiert. So können aus demselben DNA-Abschnitt durch alternatives Splicen unterschiedliche mRNA-Moleküle entstehen. Im Cytoplasma erfolgt, nach dem Ausschleusen der mRNA aus dem Zellkern, mit Hilfe der Ribosomen die Proteinbiosynthese durch Translation der mRNA. Transkriptionsfaktoren stellen Regulatoren dar, die für die Initiation der Transkription von Bedeutung sind. Es sind Proteine, die neben der Initiation, auch die Elongation und Termination beeinflussen. Sie können direkt an DNA binden und so Promotoren aktivieren bzw. reprimieren oder über andere DNA-bindende Proteine Kontakt zur DNA aufnehmen. Man unterscheidet basale (allgemeine) und Zell-/Gewebe-spezifische Transkriptionsfaktoren.

Wie schon erwähnt sind BRCT-Domänen-Proteine in sehr unterschiedliche zelluläre Vorgänge involviert. TopBP1 ist zwar nach dem heutigen Wissensstand in der Lage, unspezifisch an DNA zu binden, benötigt aber dem Anschein nach für die direkte Bindung an spezifische Promotorsequenzen die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, wie Miz1, E2F1 oder E2 (Herold *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Boner *et al.*, 2002). Durch diese Interaktion scheint TopBP1 in der Lage zu sein, die transkriptionelle Aktivität dieser Faktoren zu modulieren. Im Falle von E2F1 und Miz1 wirkt TopBP1, durch die Rekrutierung des Bgr1/Brm-Chromatin-remodeling-Komplexes bzw. durch die Bindung an Proteindomänen, die für die Transkriptionsaktivierung notwendig sind, als transkriptioneller Co-Repressor, (Liu *et al.*, 2004, Herold *et al.*, 2002). Eine TopBP1-Überexpression hemmt die transkriptionelle Aktivität von E2, während eine Deletion der N-terminalen Region von TopBP1 die Aktivität steigert (Boner *et al.*, 2002). Genau diese Region der TopBP1-Homologe in Hefezellen ist bekannt für ihre transkriptionelle Aktivität.

Über TopBP1-Zielgene oder Proteine, die diese erste und zweite BRCT-Domäne von TopBP1 hemmen, ist momentan nichts bekannt. Die C-terminale Region des BRCT-Domänene-Proteins BRCA1 ist ebenfalls in die Transkriptionsaktivierung eingebunden. Das Gen *BRCA1* (*breast cancer 1*) bzw. Mutationen dieses Gens sind maßgeblich an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt. Daneben steht es in engem Zusammenhang mit der Bildung von Ovarialkarzinomen, Kolonkarzinomen und Prostatakarzinom. Es kodiert für das Protein BRCA1, welches unter anderem den Zellzyklus kontrolliert und löst im Falle irreparabler DNA-Schäden Apoptose aus. Neben *BRCA1* sind auch die Gene *BRCA2* und *BRCA3*, die die Proteine BRCA2 und BRCA3 codieren, in die Krebsentstehung einbezogen. BRCA1 besitzt mehrere Domänen, darunter ein RING-Finger-Motiv für die DNA-Bindung, das Granin-Motiv für die nukleäre Lokalisation und RAD5-Interaktion, eine Transkriptionsdomäne und eine BRCT-Domäne für DNA-Reparatur und Zellmetabolismus. Da neben Sequenzhomologien auch funktionelle Ähnlichkeiten zwischen BRCA1 und TopBP1 gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob *TopBP1* ebenso wie *BRCA1* in direktem Zusammenhang mit bestimmten Krebsarten steht.

In einer Studie wurden 125 finnische Familien, in denen Brustkrebs und/oder Eierstockkrebs auftraten, hinsichtlich Keimbahnmutationen untersucht (Karppinen *et al.*, 2006). Dabei konnten 19 verschiedene Sequenzveränderungen im *TopBP1*-Gen registriert werden. Bei einer heterozygoten Arg309Cys-Variante wurde eine erhöhte Frequenz (gegenüber der Kontrolle) innerhalb der familiären Krebsfälle verzeichnet (Abb.4).

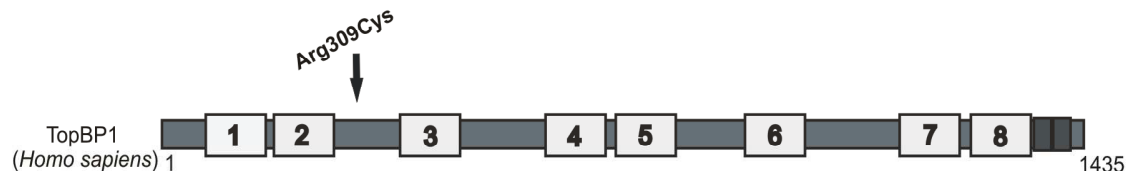


Abb.4: Lokalisation der Mutation Arg309Cys innerhalb des TopBP1-Proteins

Diese Daten deuteten darauf hin, dass diese Mutation in engem Zusammenhang mit einer Erhöhung des Brustkrebs- und/oder Ovarialkrebsrisikos steht. Dies war die erste Studie, in der ein Mutationsscreening für das *TopBP1*-Gen mittels familiärem Krebsmaterials erfolgte (Karppinen *et al.*, 2006).

1.2 Vorangegangene Studien

Die vorliegende Arbeit schließt, wie bereits erwähnt, an die Dissertation „Das Miz1-interagierende Protein TopBP1-Identifizierung neuer Interaktionspartner und Untersuchungen zur Rolle bei der Zellzyklusregulation“ von Y. Wollmann an (Wollmann, 2005). Im Folgenden werden die zu Beginn der vorliegenden Dissertation existierenden Daten zusammengefasst und die Aufgaben und Zielstellungen der durchzuführenden Arbeiten abgeleitet.

1.2.1. *In vitro* Interaktion von TopBP1 und PARP-1

Die strukturelle Ähnlichkeit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 mit der Auto-Modifikationsdomäne von PARP-1 und des PAR-Bindemotivs innerhalb der 6. BRCT-Domäne initiierten Interaktionsstudien beider Proteine.

Hierzu wurden unter anderem *in vitro* Interaktionsassays mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt. PARP-1-Teilfragmente PARP_{DBD-AD} (aa 1-524) und PARP_{DBD} (aa 1-372) wurden radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin markiert. TopBP1-Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert. Bei diesen Fragmenten handelte es sich um die sechste BRCT-Domäne, ein flankierendes Fragment, das als Kontrolle diente und um den C-terminalen Teil, der die BRCT-Domänen 6-8 umfasst. Die an Sepharose gekoppelten TopBP1-Fragmente GST-TopBP1-BRCT6 und GST-TopBP1-BRCT6-8 wurden mit beiden radioaktiv markierten PARP-1-Teilfragmenten inkubiert. Folgende Interaktionen konnten nachgewiesen werden:

PARP_{DBD-AD} (aa 1-524) interagiert sowohl mit der 6. BRCT-Domäne als auch mit dem BRCT-6-8-Teilfragment. Die PARP-1-DNA-Bindedomäne allein (PARP_{DBD}) hingegen war

nicht in der Lage, an die TopBP1-Fragmente zu binden. Folglich musste die Automodifikationsdomäne von PARP-1 vorhanden sein, um eine Bindung mit der 6.BRCT-Domäne von TopBP1 zu gewährleisten. Die Bestätigung dieser Aussage wurde mit Hilfe weiterer GST *Pull-down*-Experimente erbracht. Hierfür wurden PARP_{DBD-AD} (aa 1-524) und PARP_{DBD} (aa 1-372) in den pcDNA3-Vektor kloniert und nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen exprimiert. Die Zelllysate wurden in verschiedenen Ansätzen zu GST, GST-ctrl. und GST-TopBP1-BRCT6 gegeben. Es folgte der Nachweis der interagierenden Proteine mittels Immunoblot. Auch hier konnte allein die Bindung der PARP-1-DNA-Bindedomäne an die 6. BRCT-Domäne nachgewiesen werden. Wildtyp-PARP-1, welches von den HeLa-Zellen konstitutiv exprimiert wird, wurde in diesem Versuch ebenfalls als Interaktionspartner der 6.BRCT-Domäne gezeigt (Abb.6).

Der notwendige Nachweis der *in vitro* Interaktion der Gesamtlängenproteine PARP-1 und TopBP1 konnte in der Arbeit Y. Wollmanns nicht dargestellt werden und ist Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit.

1.2.2. *In vivo* Interaktionen von TopBP1 und PARP-1

Mittels spezifischer Antikörper für TopBP1 und PARP-1 wurden beide Proteine aus HeLa-S3-Lysaten immunopräzipitiert. Die Versuche zeigten, dass mit dem TopBP1-Antikörper neben TopBP1 auch eine geringe Menge PARP-1 präzipitiert wurde.

Allerdings konnte eine Copräzipitation von TopBP1 mittels eines monoklonalen PARP-1-Antikörpers nicht erreicht werden.

Um die *in vivo* Interaktion beider Proteine zwingend nachzuweisen, war eine Coimmunopräzipitation von TopBP1 und PARP-1 sowohl mit PARP-1-, als auch mit TopBP1-Antikörpern Gegenstand der nachfolgenden Arbeit. Der Aspekt der Schadensregulation nach UVB-Bestrahlung in HeLa-S3-Zellen sollte zusätzlich berücksichtigt werden. Folglich waren Coimmunopräzipitationsexperimente mit unbehandelten und UVB-behandelten Zellen durchzuführen.

1.2.3. Colokalisation von TopBP1 und PARP-1 in den Kernen von HeLa-Zellen

Durch Immunfluoreszenzfärbungen in fixierten HeLa-Zellen wurde die intrazelluläre Verteilung der Proteine TopBP1 und PARP-1 betrachtet. Es zeigten sich typische Verteilungsmuster beider Proteine. Mit Rücksicht auf die Grenzen dieser Methode, konnte eine räumliche Nähe beider Proteine im Zellkern und den Nukleoli gezeigt werden.

Da in der Arbeit von Y. Wollmann die Betrachtung der fluoreszenzgefärbten Proteine an einem Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus) realisiert wurde, war die Qualität der erzeugten Bilder unzureichend. Mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops der Firma Zeiss sollten nun qualitativ höherwertige Aufnahmen von HeLa-Zellpräparaten angefertigt werden. Auch bei diesen Versuchen sollte die Auswirkung von UVB-Strahlung auf die Verteilung beider Proteine in HeLa-Zellen beleuchtet werden.

1.2.4. PARP-1 ADP-ribosyliert TopBP-BRCT6

Erste Experimente von Y. Wollmann zeigten eine *in vitro* ADP-Ribosylierung im Bereich der 6. BRCT-Domäne des Proteins TopBP1 durch PARP-1. GST-TopBP1-BRCT6 und GST-TopBP1-BRCT6-8 wurden dazu mit rekombinantem PARP und NAD⁺ in einer Poly(ADP-ribosyl)ierungsreaktion nach Ferro & Olivera (1982) inkubiert. Es folgte die Analyse der Reaktionsansätze im Western Blot. Der Nachweis von Poly(ADP-Ribose)-Ketten (PAR) an den ribosylierten Proteinen wurde mit Hilfe von anti-PAR-Antikörpern erzielt. Ein GST-Antikörper zeigte, ob die detektierte PAR-Bande mit der Höhe der GST-Bande und folglich mit der des jeweiligen GST-Fusionsproteins übereinstimmte. Anhand des GST-Blots zeigte sich, dass die Banden beider TopBP1-Teilfragmente, GST-BRCT6 und GST-BRCT6-8, den Banden der PAR-Signale entsprechen.

In der vorliegenden Dissertation sollte nach dem Nachweis der ADP-Ribosylierung der TopBP1-Teilfragmente die Poly(ADP-Ribosyl)ierung des kompletten Proteins TopBP1 durch PARP-1 erfolgen.

1.2.5. Funktionelle Aspekte der ADP-Ribosylierung des Proteins TopBP1

Die Arbeiten von Y. Wollmann führten zu einem hypothetischen Modell (Herold *et al.*, 2002, Wanzel *et al.*, 2003), in dem beschrieben wurde, dass Miz1 und p53 an den *P21CIP1*-Promotor binden und als Folge von UV-Bestrahlung die Expression von *P21CIP1* bewirken. Das Protein p21 kann die Aktivitäten von Cdk's hemmen, die für den Eintritt in die S-Phase

unabdingbar sind (Sherr & Roberts, 1999). Durch die Bindung von Myc und TopBP1 wird die Miz1-Aktivität reguliert. Dabei erfolgt bei bestehender Bindung eine Repression der Transaktivierung durch Miz1.

Die Daten der Arbeit Y. Wollmanns ließen einen Komplex, bestehend aus TopBP1, PARP-1 und Miz1, vermuten, der in unbehandelten Zellen vorliegt (Abb.5). Die Bindung von PARP-1 und TopBP1 sollte über die sechste BRCT-Domäne bzw. die Automodifikationsdomäne realisiert werden. Die siebente BRCT-Domäne ist die Bindungsstelle von Miz1 an TopBP1 (Herold *et al.*, 2002). PARP-1 und Miz1 wären zunächst inaktiv. Eine Aktivierung von PARP-1, die nach DNA-Schäden erfolgt, würde neben der Auto-(ADP-ribosyl)ierung von PARP-1 eine Oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1 an der sechsten BRCT-Domäne bewirken. Aufgrund dieser Prozesse könnte es einerseits zur Dissoziation des TopBP1-PARP-1-Komplexes kommen. Andererseits könnte das Anfügen der PAR-Ketten im Bereich der sechsten BRCT-Domäne von TopBP1 auch die Assoziation mit Miz1 an der benachbarten siebenten BRCT-Domäne sterisch behindern. Miz1 würde aus dem Komplex freigesetzt, p21Cip1 exprimiert, und daraus folgend Cdk's inhibiert werden. Zellzyklusarrest wäre die Folge, die Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden verschaffen könnte. Sollten die Schäden irreparabel sein, könnten die Aktivitäten von PARP-1 oder p53 Prozesse der Apoptose einleiten (Überblick in Shiloh, 2003).

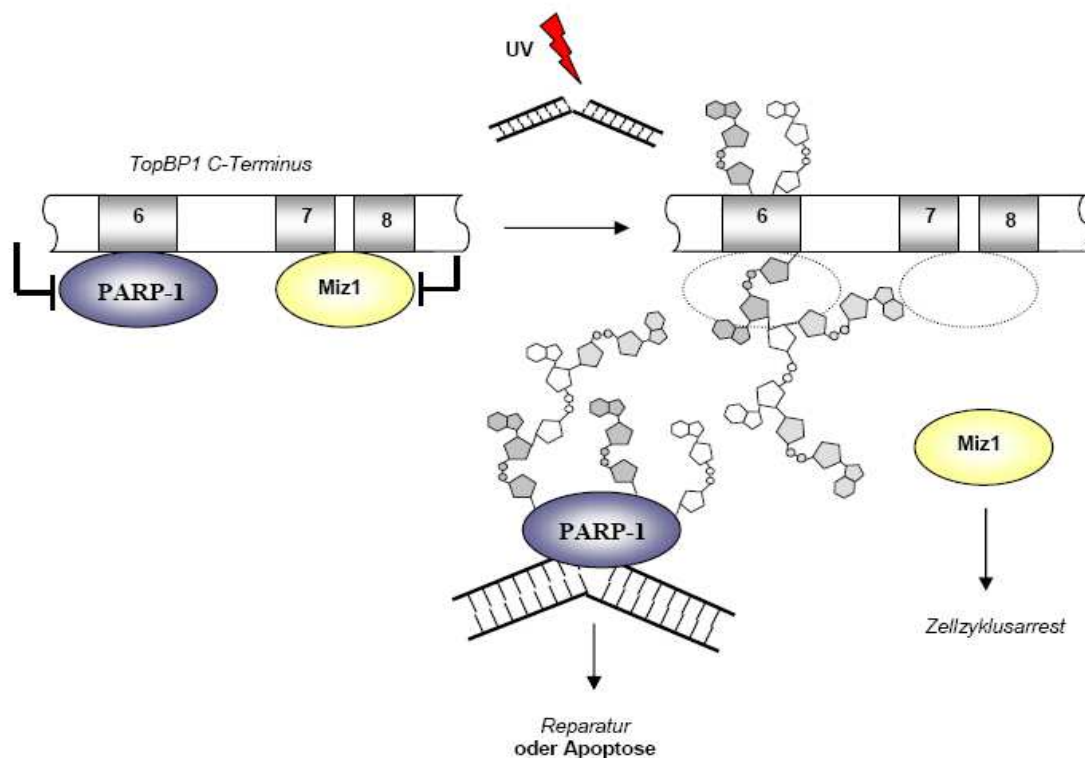


Abb.5: Modell für einen hypothetischen Mechanismus für die Dissoziation des TopBP1-Miz1-PARP-1-Komplexes nach DNA-Schädigung (Dissertation Y. Wollmann)

Miz1 steht andererseits unter der Kontrolle des Proto-Onkogens Myc (Staller *et al.*, 2001, Herold *et al.*, 2002). Liegt eine deregulierten Myc-Expression vor, besteht daher die Gefahr einer malignen Transformation, indem Myc z.B. die Transkription von *P21CIP* reprimiert wird (Gartel *et al.*, 2001, Sheen & Dickson, 2000, Wu *et al.*, 2003). Zudem hemmen auch andere Proteine wie z.B. 14-3-3 η durch ihre Interaktion mit Miz1 die Bindung von Miz1 an DNA (Wanzel *et al.*, 2005).

Den Einfluss von PARP-1 auf die Funktionen von TopBP1 und damit die Rolle der Poly(ADP-Ribosyl)ierung von TopBP1 auf das Myc-Miz1-Regulationsnetzwerk funktionell zu untersuchen, war ein weiteres wesentliches Ziel der hier vorliegenden Arbeit.

1.2.6. *In vivo* Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45

Y. Wollmann zeigte in ihrer Arbeit weiterhin, dass sich die TopBP1-Expression und -Bindung an Chromatin im Verlauf des Zellzyklus verändert. Sie wies eine höhere TopBP1-Konzentration zu Beginn der S-Phase nach, die im weiteren Verlauf des Zellzyklus in Richtung G2/M-Übergang abnahm. Auch Mäkinemi *et al.* (2001) und Yamane *et al.* (2002) beschrieben eine erhöhte TopBP1-Expression auf mRNA- und Gesamtproteinebene in der S-Phase nach Serumstimulation hungernder Zellen.

Die replikative DNA-Synthese kann mit neutralisierenden Antikörpern gegen DNA Polymerase α und ϵ ebenso gehemmt werden, wie mit einem TopBP1-Antiserum (Pospiech *et al.*, 1999; Mäkinemi *et al.*, 2001). Aus diesem Wissen heraus ließ sich annehmen, dass humanes TopBP1, ähnlich seinen Homologen Dpb11 bzw. Rad4/Cut5 in Hefen oder Xmus101/cut5 in *Xenopus*, eine Rolle bei der Replikation der DNA übernimmt. Da sowohl Dpb11, als auch Xmus101/cut5 mit Cdc45 interagieren (Kamimura *et al.*, 1998, van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003), lag die Vermutung einer Interaktion von humanem TopBP1 und Cdc45 nahe. Cdc45 seinerseits ist essentiell für die Initiation der eukaryotischen Replikation (Zou *et al.*, 1997, Mimura & Takisawa, 1998, Mimura *et al.*, 2000).

Mittels Coimmunopräzipitationsexperimenten in Zelllysaten synchronisierter HeLa-S3-Zellen (S-Phase-Zellen) wurde durch Y. Wollmann die Interaktion der beiden humanen Proteine TopBP1 und Cdc45 überprüft. Mit einem polyklonalen TopBP1-Antikörper konnten neben endogenem TopBP1, geringe Mengen endogenes Cdc45 copräzipitiert werden.

Aufgrund der theoretischen Annahme, dass dem Protein TopBP1 eine essentielle Rolle bei der Replikation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zukommt, sollte in der vorliegenden

Arbeit die *in vivo* Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45 Zellzyklus-abhängig untersucht werden.

1.2.7. *In vitro* Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45

Eine direkte Interaktion von Proteinen (z.B. TopBP1 und Cdc45) kann über Co-immunopräzipitationen nicht eindeutig belegt werden. Erste *in vitro* Interaktionsexperimente zum Nachweis der direkten TopBP1-Cdc45-Interaktion wurden in der Arbeit Y. Wollmanns beschrieben (GST *Pull-down*). Aufgereinigtes GST-TopBP1 wurde mit radioaktiv markiertem Cdc45 versetzt und die Bindung der Proteine über ein Autoradiogramm detektiert. Die Intensität des Signals war sehr schwach, folglich die Menge des an GST-TopBP1 gebundenem Cdc45 sehr gering. Erklärungen hierfür waren die geringe Ausbeute an aufgereinigtem GST-TopBP1. Im Coomassie-gefärbten Gel verwies zudem das ausgeprägte Bandenmuster in Bereichen kleiner 205 kDa auf Degradationen, Translationsbrüche oder Verunreinigungen des GST-Fusionsproteins hin.

Demnach war die Frage nach der spezifischen und direkten Interaktion der TopBP1- und Cdc45-Proteine nicht eindeutig zu beantworten.

Daraus schlussfolgernd ergab sich die Notwendigkeit weiterer *in vitro* Interaktionsexperimente. Außer den Gesamtlängenproteinen TopBP1 und Cdc45 sollten auch die einzelnen BRCT-Domänen 1-8 von TopBP1 und Cdc45-Teilkonstrukte (C-terminales und N-terminales Fragment) in die Analysen einbezogen werden.

Wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der oben genannten Interaktionen zwischen den Proteinen TopBP1 und PARP-1 beziehungsweise TopBP1 und Cdc45.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Das multifunktionelle Signalprotein TopBP1 ist in verschiedene zelluläre Vorgänge integriert. DNA-Replikation und DNA-Schadensantwort sind nur zwei Beispiele dieser Multifunktionalität. Da die vorliegende Arbeit an die Arbeit von Y. Wollmann (Wollmann, 2005) anschließt, sollten die dargestellten Interaktionsdaten vertieft und durch funktionelle Untersuchungen entscheidend erweitert werden.

Es lagen Hinweise auf die *in vitro* und *in vivo* Interaktionen von TopBP1 mit PARP-1 und mit Cdc45 vor. Teilweise waren die von Y. Wollmann erstellten Daten unzureichend bzw. ergänzungsbedürftig. Funktionelle Untersuchungen zu diesen Interaktionen gab es nicht. Insofern konnte die Bedeutung für den Ablauf zellulärer Prozesse nicht aufgeklärt werden. Mittels verschiedener funktioneller Assays sollten nun Auswirkungen der analysierten Interaktionen gezeigt werden.

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen *TopBP1*-Mutationen und Krebsentstehung näher beleuchtet. Beruhend auf der Arbeit von Karppinen und Kollegen (Karppinen *et al.*, 2006), würde eine dieser *TopBP1*-Mutationen das Basenpaar 1010 des Gens betreffen. Diese befindet sich in der BRCT1-2- und damit innerhalb der Transaktivierungsdomäne. Durch Substitution eines Nukleotids an dieser Position des Gens wird das Triplet **CGT** in **TGT** umgeschrieben. Dies hätte zur Folge, dass nun statt Arginin Cystein (Arg309Cys) in die Aminosäurekette des Proteins TopBP1 eingebaut würde.

Zunächst sollte die Bestimmung der Transaktivierungsaktivität des Proteins TopBP1 in zellulären Systemen mit Hilfe von BRCT-Domänen-Konstrukten (TopBP1-BRCT1-2) in niederen und höheren Eukaryoten erfolgen. Daran anschließend sollte die Auswirkung der Mutation Arg309Cys auf die transkriptionelle Aktivität mittels mutagensisierter TopBP1-BRCT1-2-Konstrukte geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Die eingesetzten Lösungen sind gegebenenfalls autoklaviert (20 Minuten, 121°C, 1 bar) oder steril filtriert und Glasgeräte hitzesterilisiert worden.

Für die Zellkultur wurden sterile Plastikmaterialien von Biochrom bezogen.

2.2. Material

2.2.1 Stämme und Zelllinien

Tab. 1: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
DH5 α TM	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA</i>	Invitrogen
BL21-Codon plus TM - RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	Stratagene

Tab. 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HeLa	Humane Zelllinie eines zervikalen Adenokarzinoms mit integriertem HPV-18 (ATCC: CCL2)	M. Dürst, Frauenklinik, FSU Jena
HeLa-S3	Klonales Derivat der parentalen HeLa-Linie, wächst adhärent als Monolayer oder in Suspension (ATCC: CCL-2.2)	C. Bauerschmidt, IMB Jena
Ls174T	Humane kolorektale Karzinomzelllinie, diploid, Wildtypallele von p53 (ATCC: CL-188)	M. Eilers, IMT Marburg

2.2.2. Vektoren und Plasmide

Tab. 3: Verwendete Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Herkunft
pBluescript® KS+	PT7, Klonierungs- u. Sequenzierungsvektor	Stratagene
pcDNA3	PCMV, Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen
pGBKT7	PT7, Zweihybridvektor	Clontech
pGEX-4T-1	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Pharmacia
pGEX-4T-3	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Pharmacia
pSUPER	Expressionsvektor für siRNA in	R. Bernards, NCI,

pSUPER-TopBP1	Säugerzellen, Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002	Amsterdam, Niederlande
pBABE-Puro	Expressionsplasmid für TopBP1-siRNA	M. Wanzel, IMT, Marburg
pBABE-GFP	Morgenstern & Land, 1990	M. Eilers, IMT, Marburg
pRSET-Cdc45L	pBABE-Puro modifiziert zur GFP-Expression	M. Eilers, IMT, Marburg
	Saha <i>et al.</i> , 1998	
pBTM116-PARP-1	Masson <i>et al.</i> , 1998	C. Bauerschmidt, FLI, Jena
pGEX6p1-TopBP1	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1 (AS 1-1435), Liu <i>et al.</i> , 2004	C. Niedergang, ESBS, Illkirch, Frankreich
pFH158	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1-BRCT6 (AS 807-916) basierend auf pGEX-4T-1	F. Hänel, HKI, Jena
pSH29	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid für GST-TopBP1-BRCT6-8 (AS 774-1320) basierend auf pGEX-4T-3	F. Hänel, HKI, Jena
pWY10	Fragment Cdc45L aus pRSET-Cdc45L, XhoI/BamHI in pGADT7	F. Hänel, HKI, Jena
pUS1	PCR-Fragment aus pSH19, pGEX6P1 EcoRI/SalI	diese Arbeit
pUS2	PCR-Fragment aus pFH173, pGEX6P1 EcoRI/SalI	diese Arbeit
pUS3	PCR-Fragment aus pFH168, pGEX6P1 EcoRI/SalI	diese Arbeit
pUS4	PCR-Fragment aus BTM116 BglII/XhoI, pGEX4T-1 BamHI/XhoI	diese Arbeit
pUS5	PCR-Fragment aus BTM116 BglII/XhoI, KS(+)BamHI/XhoI	diese Arbeit
pUS6	PCR-Fragment aus pSH19 BglII/XhoI, pGBKT7 EcoRI/SalI	diese Arbeit
pUS7	Fragment pRSETCdc45, p423Gal1 EcoRI/SalI	diese Arbeit
pUS8	Fragment aus pUS1, pCMVBD EcoRI/SalI	diese Arbeit
pFH350	PCR-Fragment aus pSH19, pCEP4 XhoI/HindIII	diese Arbeit
pFH354	PCR-Fragment aus pSH19, pCEP4 XhoI/HindIII	diese Arbeit
pFH353	PCR-Fragment aus pSH19, pCEP4 XhoI/HindIII	diese Arbeit
pFH324	Fragment aus pRSETCdc45, pCDNA3 BamHI/XhoI	diese Arbeit
pFH341	PCR-Fragment aus pW410, KS(+) EcoRI/Sal	diese Arbeit
pFH340	PCR-Fragment aus pW410, KS(+) EcoRI/Sal	diese Arbeit

2.2.3 Klonierungsprimer

Tab. 4: Verwendete PCR-Primer mit Restriktionserkennungsstellen

Name	Sequenz
Cdc45for	5'-GCGAATTCACCATGTTCTGTGCCGATTTC-3'
Cdc45rev	5'-GGCGTCGACCTAGGACAGGAGGGAAATAAGTGC-3'
Cdc45Nrev	5'-GGCGTCGACCCACAGCTTGAACCTGGCTGC-3'
Cdc45Cfor	5'-GCGAATTCATGTCTGTGCATGGACAGAAGCGG-3'
TopBP1-BRCT1-2for	5'-GCGAATTCATGCACCACCAGCGATGTGTC-3'
TopBP1-BRCT1-2rev	5'-GCCGTCGACAAGTGAATTACATATTGATTC-3'
TopBP1-BRCT3for	5'-GCGGAATTCAACAGCAAACCTGGAGCCTACAC-3'
TopBP1-BRCT3rev	5'-GCCGTCGACCTTCATCAGCTTGCTCATGCT-3'
TopBP1-BRCT4-5for	5'-GCGAATTCCAGTCTTCTGTTCAGTCATTGTG-3'
TopBP1-BRCT4-5rev	5'-GCCGTCGACAGGTGTAACGACGGTTTTTCTG-3'
TopBP1-BRCT6for	5'-GCGAATTCGCTGTGGTCTCACAACATGCCA-3'
TopBP1-BRCT6rev	5'-GCCGTCGACTGCGCTGATATCCAAGCTCATT-3'
TopBP1-BRCT7-8for	5'-GCGAATTCATTATAACGATAGAGGAGACTC-3'
TopBP1-BRCT7-8rev	5'-GCGGATCCTCGAGACTGATCCACATGTAA-3'
TopBP1-BRCT1-2mut	5'-ACAATTGATAGTTGTACTCTTTCAG-3'
PARP-1for	5'-GCCAGATCTATGGCGGAGTCTTCGGATAAG-3'
PARP-1rev	5'-GCCCTCGAGTTACCACAGGGAGGTCTTAAA-3'
pCMVBD-BRCT1-2mutA	5'-CCAGATCAACACAATTGATAGTTGTACTCTTTCAGATGTCAGCAA-3'
pCMVBD-BRCT1-2mutB	5'-TTGCTGACATCTGAAAGAGTACAACATCAATTGTGTTGATCTGG-3'

2.2.4 Medien

2.2.4.1 Medien zur Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Luria Broth-Medium (LB): 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

LB_{Amp}-Medium: LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin

LB_{Kana}-Medium: LB-Medium; 10 µg/ml Kanamycin

LB_{Chloramphenicol}-Medium: LB-Medium; 30 µg/ml Chloramphenicol

LB-Agarplatten: 1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB; pH 7,5

SOC-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM Glucose

2.2.4.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glucose, Pyruvat, Glutamax™ I

Zusätze für komplettes DMEM-Kulturmedium: 10% FCS; 100 µg/ml Gentamicin

RPMI 1640 mit Glutamax™ I

Zusätze für komplettes RPMI 1640-Medium: 10% FCS; 100 µg/ml Gentamicin

2-fach konzentriertes Einfriermedium: 40% (v/v) DMEM oder RPMI 1640; 40% (v/v) FCS;

20% (v/v) DMSO

2.2.5 Stammlösungen

Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) in A.bidest.
Antifade	1 Volumenteil <i>p</i> -Phenylendiamin (10 mg/ml in PBS) und 9 Volumenteile Glycerin mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
Bradfordlösung	100 mg/l Coomassie Brilliantblau; 50 ml/l 95% Ethanol; 100 ml/l 85% Phosphorsäure in A.bidest.
DAPI-Stammlösung	0,1 mg/ml in A.bidest.
10 mM dNTP-Mix	je 20 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP (100 mM Stammlösung) auf 920 µl A.bidest.
1 M DTT	3,085 g DTT in 20 ml A.bidest.
0,5 M EDTA	93,06 g EDTA in 500 ml A.bidest, pH 8,0 mit NaOH eingestellt
Ethidiumbromid	10 mg/ml in A. bidest.
Giemsa-Lösung	0,1% (w/v) Kristallviolett; 0,2 Volumenteile 95% EtOH in A. bidest.
0,1 M IPTG	25 mg/ml in A.bidest.
Lösung I	25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose
Lösung II	0,2 N NaOH; 1% (w/v) SDS
Lösung III	7,5 M Na-Acetat
Natrium- <i>ortho</i> -vanadat	10 mM in A.bidest.
Paraformaldehydlösung	3,8% (w/v) in PBS
Perfect-Block	30% (w/v) in A.bidest.
Propidiumiodid-Lösung (50x)	2 mg/ml Propidiumiodid in 38 mM NaCitrat; pH 7,0

Propidiumiodid/RNase A-Lösung	40 µg/ml Propidiumiodid; 250 µg/ml RNase A in PBS
Proteaseinhibitoren: Aprotinin	1 mg/ml in A.bidest.
Leupeptin	1 mg/ml in A.bidest.
Pepstatin	1 mg/ml in Methanol
PMSF	100 mM in Isopropanol
Proteingelentfärbelösung	40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,2% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250
RNase A-Lösung:	100 mg/ml in A.bidest.
Strip-Lösung	62,5 mM Tris; 2% (w/v) SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol; pH 6,8
100% (w/v) TCA	500 g TCA auf 227 ml A.bidest.
TFB I	30 mM K-Acetat (pH 6,0); 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
TFB II	10 mM MOPS (pH 7,0); 10 mM KCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
200 mM Thymidinlösung	2,42 g in 50 ml PBS

2.2.6 Puffer

Tris-Glycin-Gellaufpuffer (1x)	33 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
Tris-Glycin-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% (w/v) SDS
Tris-Glycin-Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% (w/v) SDS
Anodenpuffer für Triscin-Proteingele	200 mM Tris, pH 8,9
Kathodenpuffer für Tricin-Proteingele	100 mM Tris; 100 mM Tricin; 0,1% (w/v) SDS
Gelpuffer für Tricin-Proteingele	3 M Tris (pH 8,45); 0,3% (w/v) SDS
Proteingelladepuffer (2x)	5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8); 4 ml 20% SDS; 1 ml 2-Mercaptoethanol; 4 ml 50% Glycerin; 0,004 g Bromphenolblau; 6 ml A.bidest.
Laufpuffer	122 g Tris; 30 g Glycin; 15 g SDS
Transfer-Puffer	2,93 g Tris; 6 g Glycin; 20% (v/v) Methanol
HB-Puffer	20 mM HEPES (pH 7,8); 100 mM KCl; 5 mM MgCl ₂

Zelllysepuffer I/II	150 mM NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 0,25% (v/v) NP-40 (Puffer I); 1% (v/v) NP-40 (Puffer II)
Puffer A für Zellfraktionierung	10 mM HEPES (pH7,9); 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ , 0,34 M Saccharose, 10% Glycerin, 1 mM DTT
Puffer B für Zellfraktionierung	3 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 1 mM DTT
DEAB-Puffer (5x)	27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; 18 g Diethanolamin ad 1 l A.bidest.
DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC auf 1 l A.bidest.
Glutathionelutionspuffer	10 mM Glutathion _{reduziert} ; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
MOPS-Puffer (10x)	41,85 g MOPS; 6,8 g Na-Actetat-3H ₂ O; 20 ml DEPC behandelte 0,5 M EDTA-Lösung; pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen, auf 1 l DEPC-H ₂ O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl; 26,8 g Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O; 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l A.bidest.; pH 7,4
DNA-Ladepuffer (4x)	3 ml 87% Glycerin; 0,25 ml 20% SDS; 1 ml 0,5 M EDTA; 0,2% (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml A. bidest.
TBS (1x)	50 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS-T (1x)	1 ml Tween-20 in 1 l TBS
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57,1 ml Eisessig auf 1 l A.bidest.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

2.2.7 Chemikalien

Glutathion-SepharoseTM4B, [³⁵S]Methionin (**Amersham Pharmacia**), Fötales Kälberserum (FCS), Gentamicin (**Gibco**), Trypanblau, Trypsin/EDTA (**Biochrom**)

Ammoniumpersulfat (APS) (**BioRad**)

Agarose, Hefeextrakt, Isopropylthio-β-D-galactosid (IPTG), Kanamycin, LipofectamineTM 2000, RPMI-1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (**Invitrogen**), Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Chloramphenicol, Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) (**Roche**)

Bromphenolblau (**Chemapol**), Bacto-Trypton (**Difco**)

Primer für die PCR (**MWG Biotech**)

Aceton, Borsäure, Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Coomassie®Brillantblau G250, Chloroform, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N'-tetraessigsäure (EGTA), Glucose, Glycin, Glycerin, Isopropanol, Kaliumacetat, Lithiumchlorid, Methanol, 2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumazid, Natriumchlorid, Nonidet P-40 (NP-40), Phenol, Phenol/Chloroform, *o*-Phosphorsäure, Rotiphorese® Gel30 (30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1), Salzsäure (HCl), verschiedene Salze, Trichloressigsäure (TCA), TritonX-100, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Tricin), Tris, Tween-20 (**Roth**)

Perfect-Block (**MoBiTec**)

Agar, Ampicillin Natriumsalz, Diethanolamin, Dimethylsulfoxid (DMSO), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-N,N,N'-tetraessigsäure (EGTA), Igepal-CA630, Natrium-*o*-vanadat, N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 4',6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI), 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), Mineralöl, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), Paraformaldehyd, Protein G-Sepharose, *p*-Phenyldiamin, Propidiumiodid, reduziertes Glutathion, Thymidin (**Sigma-Aldrich**)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (**Serva**), Adriamycin, Kristallviolett, Magermilchpulver, Puromycin-Dihydrochlorid (**Merck**)

2.2.8 Größenstandards

Protein-Größenstandard: BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen)
Kaleidoskope Prestained Standard (BioRad)
DNA-Größenstandard: Lambda DNA/*Eco*47III/*Eco*911 (MBI Fermentas)
pBR322 DNA/*Alu*I (MBI Fermentas)
50bp DNA Step Ladder (Promega)

2.2.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche)
Bovine Poly(ADP-ribose)Polymerase (Calbiochem™)
Pfu Turbo® DNA Polymerase (Stratagene)
PowerScript™ Reverse Transcriptase (BD Clontech)
Pwo DNA Polymerase (PeqLab)
RNase A (Serva)

Restriktionsendonucleasen (Invitrogen)
Sawady Taq DNA Polymerase (PeqLab)
T4 DNA Ligase (Invitrogen)

2.2.10 Filme, Filter und Geräte

Blotting-Apparatur (BioRad)
CO₂-Brutschrank IG150 (Jouan)
Film Hyperfilm™ ECL (Amersham)
Film X-OMAT™AR, XAR 5 (Kodak)
Fluoreszenzmikroskop BX51 (Olympus), Kamera DP50 (Olympus), Software Analysis®
Geldokumentationsanlage und Software: GeneSnap (Syngene)
Gelelektrophoreseapparatur (BioRad)
Geltrockner SGD4050 (Savant)
GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)
Konfokales Laser Scanning-Mikroskop Axiovert 200 M/LSM 510 META (Carl Zeiss)
Laborwaage (Sartorius)
Magnetrührer/Heizplatte IMAK®RCT (Janke&Kunkel)
Mikroskop Telaval 31 (Zeiss)
ND-1000 (NanoDrop®) Software: NanoDrop 2.4.7c
Optitran Transfer Membran (Millipore)
pH-Meter pH537 (WTW)
PCR-Geräte: RoboCycler™ 40 (Stratagene)
Rotationsschüttler (Infors HT)
Rotator Rotamix RM1 (ELMI)
Schüttelwippe WT12 (Biometra)
Scanner: GMS 418 Array Scanner, Genetic Microsystems (MWG Biotech AG)
Sonicator LABSONIC U (B.Braun)
Sterile Arbeitsbank Faster BHA48 (Kendro)
Sterile Werkbank *LaminAir*® HB2448 (Heraeus)
Thermomixer 5436 (Eppendorf)
UV/VIS-Spectrophotometer: DU®640 (Beckmann)
Zentrifugen: Biofuge *fresco* (Heraeus); Sigma 3K18 (Sigma); Sorvall®RC 5C *Plus* (Sorvall)

2.2.11 Antikörper

2.2.11.1 Primärantikörper

Tab. 5: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Klon	Verdünnung
Kaninchen anti-TopBP1	Novus Biological	Polyklonal	WB (1:1000); IP (3µg/ml) IF (1:100)
Maus anti-TopBP1	BD Biosciences	33	WB (1:250); IF (1:100)
Ratte anti-Cdc45	AG Große, FLI Jena	3G-10	WB (1:5); IP (80 µl/ml) IF (1:2)
Maus anti-PARP-1	BD Biosciences	4C10-5	WB (1:500); IP (2µg/ml) IF (1:100)
Maus anti-PAR	BD Biosciences	10H	WB (1:500); IF (1:200)
Maus anti-BrdU	BD Biosciences	3D4	WB (1:500); IF (1:100)
Maus anti-PAR	BD Biosciences	920-4-41	WB (1:100)
Maus anti-Histon H1	BD Biosciences	polyklonal	WB (1:100)
Maus anti-Lamin B1	BD Biosciences	polyklonal	WB (1:1000)
Maus anti- β-Aktin	Sigma	AC-74	WB (1:1000)
Maus anti-His-tag	Cell Signaling	27E8	WB (1:500)
Maus anti-GST	BD Biosciences	H-298	WB (1:200)
Maus anti-Orc2	BD Biosciences	920-4-41	WB (1:200)
Kaninchen anti-c-Kit	Cell Signaling	polyklonal	WB (1:1000)
Maus anti-Mek2	BD Biosciences	96	WB (1:2500)
Maus anti-Sos1	BD Biosciences	25	WB (1:250)
Maus anti-MAP3K2	Abnova	polyclonal	WB (1:2000)
Kaninchen anti-Cdk2	Santa-Cruz	polyklonal	WB (1:100)
Maus anti-Gal4 (DBD)	Santa-Cruz	RK5C1	WB (1:100)

2.2.11.2 Sekundärantikörper

Tab. 6: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Konjugation	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova	HRP	1:10000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	RRX	1:1000
Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	Dianova	HRP	1:10000
Ziege anti-Ratte IgG	Dianova	Cy2	1:1000
Ziege anti-Maus IgG	Dianova	HRP	1:10000
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	FITC	1:500

2.2.12 Kits

ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham)

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (PROMEGA)

NucleoSpin[®] Extraction Kit (BD Clontech)

NucleoBond[®] Plasmid Midi Kit, AX 100 und Maxi Kit AX 1000 (BD Clontech)

QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)

RNAi Starter Kit (QIAGEN)

Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham)

TNT[®]T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

2.3 Methoden

2.3.1 Transformation von *Escherichia coli* nach Hanahan (1983)

2.3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem *E. coli*-Stamm DH5α beimpft und über Nacht auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm und 37°C kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur beimpft- vorbereitend wurden hierfür 100 ml LB-Medium mit 10 mM KCl und 20 mM MgSO₄ versetzt- und für 1,5 bis 2 Stunden (bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3) bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 15 ml TFB I-Lösung resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das

Bakterienpellet wurde in 2 ml TFB II-Lösung resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

200 µl der aliquotierten, kompetenten Bakterien wurde mit 10-20 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Erwärmung dieses Ansatzes 2 min bei 42°C und die Inkubation für 2 min auf Eis. Nun wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C geschüttelt. Auf selektivem Medium (die Zugabe entsprechender Antibiotika erfolgte) wurden verschiedene Volumina ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Die Grundlage dieser Methode ist die alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979).

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden im Eppendorf-Tube bei maximaler Geschwindigkeit 5 min einer Mikrozentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lösung I resuspendiert, 200 µl Lösung II zugegeben und unter vorsichtigem Mischen erfolgte die Zelllyse 5 min auf Eis. Anschließend erfolgte die Fällung der Proteine, Lipide und chromosomaler DNA nach Zugabe von 200 µl Lösung III auf Eis für 5 min. Das Lysat wurde für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt, mit 0,6 Volumen Isopropanol gemischt und die präzipitierten Nucleinsäuren 15 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde 3x mittels 70%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl A.bidest. gelöst.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Midi-und Maxipräparation)

Für die Präparation größerer DNA-Mengen aus Bakterienkulturen (25 ml bzw. 200 ml) wurden die Kits NucleoBond AX100 bzw. AX200 nach Angaben des Herstellers Clontech verwendet.

2.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Mit Hilfe des Thermo Sequenase™ Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (mit 7-deaza-dGTP) von Amersham Biosciences und des Li-cor 4000-Sequenzierers von MWG Biotech erfolgte die Sequenzierung von Plasmid-DNA.

2.3.5 Bearbeitung von Plasmid-DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonucleasen, die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Ligationen, Dephosphorylierungen und weitere enzymatische Reaktionen wurden nach Empfehlungen der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1998) durchgeführt.

2.3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Definierte DNA-Fragmente wurden über PCR-Reaktionen in einem Volumen von 100 µl amplifiziert. Als Matrize diente Plasmid-DNA. Die Zugabe der *Pwo*-Polymerase erfolgte erst am Ende des ersten Denaturierungsschrittes.

Reaktionsansatz:

1 µl DNA (10-20 ng)
 1 µl *forward* Primer (100 pmol)
 1 µl *reverse* Primer (100 pmol)
 10 µl Desoxynukleotide
 (dNTPs 2 mM)
 10 µl 10x Reaktionspuffer
 2 U *Pwo*-Polymerase
 75 µl A.bidest.

PCR-Programm (Stratagene RoboCycler):

Erst-Denaturierung	96°C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	1 min	30 Zyklen
Primer-Anlagerung	60-68°C	1 min	
Verlängerung	72°C	1-2 min	
Komplettierung	72°C	10 min	1 Zyklus

2.3.7 Zielgerichtete Mutagenese

Das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die zielgerichtete Mutagenese des TopBP1-BRCT1-2 Konstruktes zu erzielen. Die verwendeten Primer sind Tabelle 4 unter 2.2.3 zu entnehmen.

2.3.8 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

HeLa-, HeLa S3- und Ls174T-Zellen wurden adhärent als Monolayer auf Plastikgewebekulturplatten oder -flaschen kultiviert. Für HeLa- und HeLa S3-Zellen diente DMEM mit Glutamax I™ als Kulturmedium, komplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min) und Gentamicin (100 µg/ml). Ls174T-Zellen hingegen wurden in RPMI-1640 mit Glutamax I™, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, Gentamicin (100 mg/ml) gehalten. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 96% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂. Um die Zellen für die Subkultivierung abzulösen, wurden die Zellen mit einem Zellschaber oder mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% w/v

Trypsin/2 mM EDTA) behandelt. Die Kulturen wurden regelmäßig über eine DAPI-DNA-Färbung fluoreszenzmikroskopisch auf Mycoplasmen-Kontaminationen überprüft.

Hierzu wurden Zellen abtrypsinisiert und auf einer neuen Kulturplatte mit Deckgläschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen für 20 min mit 3 ml Fixierlösung inkubiert, die Fixierlösung abgesaugt und durch 2 ml DAPI-Lösung ersetzt. Nun wurde die DAPI-Lösung 1:1000 in PBS verdünnt. Es folgte eine 5minütige Inkubation der Zellen mit dieser Lösung. Nachdem die Zellen auf dem Deckgläschen mit A. bidest. gewaschen und das Deckgläschen mittels Antifade auf dem Objektträger fixiert wurde, konnte die Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

2.3.9 Transfektion eukaryotischer Zellen

2.3.9.1 Transfektion mit FuGene HD von Roche

Die transiente Transfektionen von HeLa- und Ls174-Zellen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Menge der transfizierten DNA richtete sich nach der Größe des Kulturgefäßes. Je nach Versuchsaufbau und -ziel folgte die Inkubation der Zellen 24-96 h.

Im Falle der stabilen Transfektion mit Expressions- und Selektionsvektor (pCEP4) betrug das Verhältnis der Vektoren 1:2. 24 h nach dieser Transfektion wurden die Zellen geerntet, 1:4 gesplittet und auf Kulturmedium, welchem 250 µg/ml Hygromycin zugesetzt wurde, ausgesät. Nach 7 Tagen konnten die Zellen geerntet und nachfolgenden Analysen zugeführt werden.

2.3.10 Plasmidkonstruktion

Um den sequenzspezifischen Abbau komplementärer mRNA zu bewirken und damit die Genexpression gezielt zu unterdrücken, werden kurze interferierende RNAs (siRNA) eingesetzt. In dieser Arbeit wurden hierzu der pSUPER Vektor (pSUPER: *suppression of endogenous RNA*) und dessen Derivat pSUPER-TopBP1 nach Brummelkamp *et al.* (2002) verwendet. Oligonukleotide mit der 19-nt Zielsequenz für siTopBP 5'-AAGCTTGGCTGCAGAATTG-3' wurden über die in den Oligonukleotidsequenzen enthaltenen *Hind*III- und *Bgl*II-Stellen mit dem pSUPER-Vektor ligiert. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Michael Wanzel (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt. Bei der Wahl der Zielregion für siRNAs ist darauf zu achten, dass sie im Genom einmalig ist und einzig im Zielgen vorkommt. Um dies sicherzustellen wurde die Sequenz einem Abgleich mit der Datenbank unterzogen(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

2.3.11 Mammalian-one-hybrid- und Luziferase-Assays

Ein PCR-Fragment, welches die TopBP1-BRCT1-2 Domäne enthielt, wurde in den pCMV-BD-Vektor (Mammalian Two-hybrid Assay Kit, Stratagene) kloniert (pUS6). Die Gesamtlängen-Cdc45-cDNA aus pRSETC-Cdc45L wurde in einen pCDNA3-Vektor (Invitrogen) gebracht (pcDNA3-Cdc45L). Es folgte die Co-Transfektion von HeLa-Zellen (1×10^5 Zellen) in den folgenden Plasmid-Kombinationen:

1) pCMV-BD (Stratagene), pFR-Luc- Luciferase-Reportervektor (Stratagene) und Renilla-Kontrollvektor pHRLTK (Promega) als Negativkontrolle; 2) pUS6, pFR-luc und pHRLTK als Mammalian-One-hybrid-System; 3) pUS6, pcDNA3-Cdc45-L, pFR-luc und pHRLTK, für die Bestimmung des Einflusses der Cdc45-L- Interaktion auf die Transaktivierung von TopBP1-BRCT1-2 in Säugerzellen. Nach 36h wurden die zuvor transfizierten Zellen zunächst mit 1xPBS-Puffer gewaschen. Nach Angaben des Herstellers Promega wurden die Zellen mittels Passive Lysis Buffer des Dual-Luciferase[®]Reporter Assay Systems lysiert. Nach der Lyse folgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers die Auswertung der Luziferase- Aktivitäten der Zelllysate am Luminoscan- Luminometer (Labsystems).

2.3.12 Indirekte Immunfluoreszenz

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und kultiviert. Nach dem Waschen mit PBS, folgte eine 10minütige Fixierung in 3,8% Paraformaldehyd. Um die Zellen zu neutralisieren, wurden sie 2x mit 0.1 M Glycin/PBS gewaschen und anschließend 10 min in 0,5% (v/v) NP-40/PBS permilisiert. Danach wurden die Zellen in 0,1% NP-40/PBS/5% FCS- Lösung für mindestens 1h geblockt. Es folgte die einstündige Inkubation mit verdünnten Primärantikörpern. Für alle Antikörper- Verdünnungen wurde 0,1% NP-40/PBS/5% FCS- Lösung als Medium genutzt. Nach der Behandlung mit den Erstantikörpern wurden die Zellen 3x mit 0,1% NP-40/PBS gewaschen und mit FITC- bzw. RRX-, bzw. Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Behandlung mit den Zweitantikörpern wurde in einer dunklen Box durchgeführt. Für die Färbung der Zellkernkompartimente erfolgte zusätzlich eine DAPI- Färbung (100 µg/µl). Im Anschluss wurden die Zellen 3x mit 0,1% NP-40/PBS, 1x mit PBS und 1x mit A. bidest. gewaschen, getrocknet und mit Mounting-Fluid eingedeckt. Die Fluoreszenzbilder wurden am Konfokalen Laser Scanning-Mikroskop Axiovert 200 M/LSM 510 META (Carl Zeiss) erstellt. Die Bearbeitung der Bilder geschah mittels der LSM-510-META 3.2-Software (Carl Zeiss) und des Programms Adobe PS (Microsoft).

2.3.13 Synchronisierung von HeLa-S3-Zellen

2.3.13.1 Synchronisierung mittels Thymidin bzw. Mimosin

Thymidindesoxyribose oder kurz Thymidin (TdR) wurde genutzt, um HeLa S3-Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren. dNTPs sind notwendig, um die Replikation der DNA in der S-Phase zu ermöglichen. Das Schlüsselenzym hierbei ist die Ribonukleotid-Reduktase. Diese wandelt Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide auf der Stufe der Diphosphate um. Es erfolgt die Phosphorylierung der dabei entstehenden dNDPs zu dNTPs. Einige dieser Produkte hemmen die Ribonukleotid-Reduktase (feedback-Hemmung). So hemmen auch hohe Konzentrationen an Thymidin die Ribonukleotid-Reduktase durch das entstehende TTP, noch bevor genügende Mengen der drei anderen dNTPs für die Replikation synthetisiert werden können. Dadurch erfolgt der Arrest der Zellen am G1/S-Übergang. Zellen in anderen Zellzyklusphasen (G2, M, G1) werden durch TdR nicht beeinflusst. Sie durchlaufen den Zellzyklus bis zum G1/S-Übergang, an dem dann die einsetzende DNA-Synthese gehemmt wird. HeLa-S3-Zellen wurden nach Bootsma *et al.* (1965), mit leichten Modifikationen, mittels doppeltem Thymidin (TdR)-Block synchronisiert. Ihnen wurden bei einer Konfluenz von 90% 5 mM TdR zugesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Zellen aus diesem ersten TdR-Block durch Entfernen des TdR-haltigem Mediums und sorgfältigem Waschen entlassen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium (ohne TdR) für 10 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es folgte der zweite TdR-Block durch wiederholte Zugabe von 5 mM TdR ins Kulturmedium. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen wie beschrieben aus dem Zellzyklus-Arrest entlassen. 15 min vor der Zellernte wurde dem Medium BrdU zugesetzt. BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridins, welches in die Zelle aufgenommen, phosphoryliert und anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphats (dTTP) in die DNA mit beginnender DNA-Neusynthese eingebaut wird. Mit einem spezifischen BrDU-Antikörper konnte somit die DNA-Synthese der untersuchten Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden. Unmittelbar nach der 15minütigen BrdU-Behandlung wurden die ersten Zellen (0 h) und nach verschiedenen Zeitintervallen (1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h,) weitere Zellen geerntet. Die Zellernte und -lyse eines Teils der Zellen erfolgte wie unter 2.3.10.3 beschrieben. Mit diesem Teil wurden Immunoblotting-Experimente durchgeführt. Ein anderer Teil der Zellen wurde gewaschen und mit 0,5 ml 70%igem Ethanol versetzt, um sie späteren FACS-Analysen (siehe 2.3.13) zuzuführen. Die Zellen konnten so fixiert bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden.

Mimosin (β -N-[3-hydroxy-4-pyridon]- α -amino-propionsäure) ist eine Aminosäure aus der Pflanzenart *Mimosaceae*, die einen reversiblen Arrest in der späten G1-Phase verursacht. Der Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse wurde rege diskutiert (Hughes und Cook, 1996; Kalejta und Hamlin, 1997; Krude, 1999). Zu den potentiellen intrazellulären Zielen zählen die Thymidin-Kinase (Lalande, 1990), die Ribonukleotid-Kinase (Krude, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1997), die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (Lin *et al.*, 1996; Oppenheim *et al.*, 2000) und die Cdk-Inhibitoren p21_{Cip} und p27_{Kip1} (Wang *et al.*, 2000).

HeLa-S3-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert und dem Kulturmedium 0,3 mM Mimosin zugesetzt. Nach 16stündiger Inkubation wurden die Zellen aus dem Mimosin-Block durch intensives Waschen (5min) und Zugabe frischen Mediums (ohne Mimosin) entlassen. Ebenfalls nach 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h erfolgte die Ernte und Lyse der Zellen wie oben beschrieben. Auch hier wurde ein Teil der Zellen für die FACS-Analyse mit 70%igem Ethanol versetzt.

2.3.13.2 Synchronisierung mit Thymidin/Nocodazol

Nocodazol ist ein synthetischer Inhibitor der Mikrotubuliformierung (De Brabunder, 1976). Aufgrund der fehlenden Ausbildung der mitotischen Spindel kommt es zu einem reversiblen Block in der Prometaphase der Mitose (Zieve, 1980). Andere Zellzyklusphasen werden nicht beeinflusst. So können Zellen am G2/M-Übergang angereichert werden.

Zunächst wurden HeLa-S3-Zellen, die eine 60-70%ige Zelldichte erreicht hatten, nach einer einzelnen Thymidingabe (5 mM) 16 Stunden kultiviert. Danach wurden sie aus dem einfachen Thymidinblock durch sorgfältiges Waschen und Mediumwechsel für 6 Stunden entlassen. Anschließend wurden die Zellen, nachdem sie die S-Phase durchlaufen hatten, mittels Nocodazol (40 ng/ml) in der G2/M-Phase arretiert. Nach weiteren 3 Stunden erfolgte das Entlassen der Zellen, die daran anschließend nach 0 h, 3 h und 6 h geerntet wurden. Die geernteten Zellen wurden teilweise wie unter 2.3.10.3 dargestellt lysiert und teilweise für FACS-Analysen mit 70%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert.

2.3.14 Durchflusszytometrie (Ormerod, 1994)

Aufgrund des veränderten DNA-Gehaltes von Zellen, die die S-Phase bzw. Mitose durchlaufen, kann bestimmt werden, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen befinden.

Folglich wurde der DNA-Gehalt der synchronisierten Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Wie unter 2.3.9.6 beschrieben wurden dazu 0,5 ml Zellsuspension bei der Zellernte der Synchronisationsexperimente entnommen. Die fixierten Zellen wurden abzentrifugiert

(500xg, 5 min, 4°C), mit PBS gewaschen und das Zellpellet wurde in 0,5 ml einer frisch angesetzten Propidiumiodid (40 µg/ml)/RNase A (250 µg/ml)-Lösung resuspendiert. Es folgte die 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Propidiumiodid, welches in die DNA interkaliert, diente der Fluoreszenzmarkierung. Mittels des FACS-Calibur und der dazugehörigen CellQuest Pro Software (beides Becton Dickinson) konnte die Messung und Auswertung der Färbung realisiert werden. Die Bestimmung der Grenzen der Zellzyklusphasen erfolgte mittels nicht synchronisierter Zellen.

2.3.15 Yeast-one-hybrid-Assay

Das TopBP1-BRCT1-2-Fragment wurde in den Gal4-DNA-Bindedomänenvektor pGBKT7 (Clontech Laboratories) kloniert. Cdc45-cDNA wurde als *EcoRI-SalI*-Fragment vom Plasmid PRSET-Cdc45L isoliert und in den Hefe-Expressionsvektor p423TEF (beinhaltet einen HIS3-Marker) gebracht. In den Hefestamm Y190 (Clontech Laboratories), welcher die Reporter-Gene *HIS3* und *lacZ* unter der Kontrolle eines Gal4-Promotors enthält, erfolgte die Transformation des TopBP1-BRCT1-2-Plasmids allein oder beider oben genannten Plasmide. Anschließend wurde mittels β -Galaktosidase-Flüssigkultur-Assays (ONPG diente hierbei als Substrat), nach einem Protokoll der Firma Clontech Laboratories, die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten vorgenommen.

2.3.16 Analyse und Expression von Proteinen

2.3.16.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Nach der Methode von Bradford wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate bestimmt.

2.3.16.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Zelllyse erfolgte 45 min auf Eis mittels Lysepuffer I bzw. II (I:0,25% NP-40; II:1% NP-40) nachdem die Zellen 1x mit PBS gewaschen und durch Abschaben der Platten geerntet wurden. Die so gewonnenen Proteinlysate wurden 20 sec bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand der Proteinbestimmung zugeführt. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Denaturierung der Proteine bei 95°C nach Zugabe von 2x bzw. 4x Gelladepuffer. Mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine im Gel über Western Blot analysiert oder durch eine Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Für die Färbung wurde das Gel 10 min in der Färbelösung geschwenkt und

anschließend mit Wasser bzw. Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

2.3.16.3 Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Gel folgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels Semi-Dry-Blotverfahren (Bio-Rad). Im Anschluss an dieses Verfahren wurde die Membran für mindestens 1 h mit 5% Magermilch/TBS-T-Puffer geblockt. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in 5% Magermilch/TBS-T-Puffer verdünnt. Die Inkubation des Primärantikörpers erstreckte sich über 1 h- 12 h, die des Sekundärantikörpers über maximal eine Stunde. Zwischen den Antikörperbehandlungen und nach der Behandlung mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 3x für jeweils 10 min mit 1x TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL⁺-Western Blotting Detection System (Amersham) und Hyperfilm (Amersham).

2.3.16.4 Stripping von Nitrocellulosemembranen

Da oftmals verschiedene Proteine auf einer Nitrocellulosemembran detektiert werden sollten, mussten die Antikörper nach der Behandlung von der Membran entfernt werden. Hierzu wurde auf 56°C erwärmte Strip-Lösung verwendet. In dieser wurde die Membran für 15 min geschwenkt, anschließend 3x mit TBS-T-Puffer gewaschen und erneut geblockt.

2.3.16.5 Coimmunopräzipitationsexperimente

HeLa-S3-Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen, geerntet und in Lysepuffer I (0,25% NP-40) lysiert. Den Lysaten wurden 10 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml Pepsatin und 1 mM PMSF zugesetzt. Nach der Lyse folgte die Zentrifugation für 20 sec, bei 10000 rpm und 4°C. Weitere Schritte erfolgten mit den Zellüberständen. Verschiedene Antikörper (anti-TopBP1, anti-Parp-1, anti-Cdc45) wurden über Nacht entweder an Protein G Plus/Protein A-Agarose-Beads (Calbiochem) oder an µMACS Protein G- Beads (Miltenyi Biotech) nach Angaben der Hersteller gebunden. Als Kontrolle dienten nicht relevante Antikörper (anti-FADD) bzw. Präimmunserum. Ebenfalls nach Hersteller-Protokoll geschah die Vorreinigung der Zelllysate mit den jeweiligen Beads. Die vorgereinigten Lysate (750 µg-1,5 mg Proteine) wurden für 1,5-2 h zu den an Beads gebundenen Antikörpern gegeben. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte das sorgfältige Waschen der Beads (s. Herstellerangaben), die Elution der co-immunopräzipitierten Proteine und die Detektion mittels Immunoblotting.

2.3.16.6 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen und deren Aufreinigung

In pGEX-Expressionvektoren wurde die gewünschte cDNA im fortlaufenden Leserahmen mit der DNA-Sequenz für das Glutathion-S-Transferase-Gen kloniert. Die Fusionsproteine wurden in BL21 Codon Plus Bakterien exprimiert. Hierzu wurde eine 5 ml-Vorkultur (LB_{Amp}-Medium) beimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt. 0,5 ml dieser Vorkultur wurden in 20 ml LB_{Amp}-Medium gegeben (Hauptkultur) und für 2 h (180 rpm, 37°C) geschüttelt. Die Induktion der Expression erfolgte mittels 100 mM IPTG. Die Bakterien wurden nun für weitere 2 Stunden unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 2000xg 5 min zentrifugiert, in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitoren (0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT) aufgenommen. Es folgte der Ultraschallaufschluss der Zellen (6x30 sec, 0,5 sec Impulse, medium Power, Labsonic U). Nun wurden die lysierten Zellen für 30 min bei 4°C in 1% (v/v) Triton X-100 auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der GST-Fusionproteine aus den Bakterienlysaten als Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathione Sepharose™ 4B (AMERSHAM) nach Angaben des Herstellers. Die GST-Fusionsproteine wurden für weitere Versuche an der Sepharose belassen und gegebenenfalls maximal 3 Tage bei -20°C gelagert.

2.3.16.7 *In vitro* Expression von Proteinen

cDNA wurde in einen Vektor kloniert, der in 5'-Position zum Insert einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Durch eine Phenol/Chloroformextraktion wurde die DNA gereinigt und in RNase-freies A. bidest aufgenommen. Nach Angaben des Herstellers Promega wurde ein *in vitro* Transkriptions/Translations-System (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System) verwendet. Dabei erfolgte die Markierung der translatierten Proteine mit [³⁵S]-Cystein (Redivue™ L-[³⁵S]-Cystein, 1000 Ci/mmol, Amersham) bzw. [³⁵S]-Methionin (Redivue™ L-[³⁵S]-Methionin, 1000 Ci/mmol, Amersham). Auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurde ein Teil des jeweiligen Reaktionsansatzes (8-10 µl von 50 µl) aufgetrennt und mittels Autoradiographie (Kodak X-Omat 50, Kodak) detektiert.

2.3.16.8 GST-Pull-down- und andere *in vitro* Interaktionsexperimente

Glutathion-Sepharose-Beads, an die das zu untersuchende Protein gebunden war, und GST allein wurden mit HB-Puffer gewaschen. Daran anschließend wurden sie mit HB-Igepal-Puffer und einem Teil der zuvor *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteine (potentielle Interaktionspartner) versetzt. Nach zweistündiger Inkubation auf einem Überkopfschüttler folgten mindestens 5 Waschschrte der Beads mit HB-Igepal-Puffer. Die

an die Beads gebundenen Proteine wurden von diesen mittels 2xSDS-Gelladepuffer bei 95°C für 5 min eluiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 8%igem SDS-Gel, konnten die radioaktiv markierten Proteine mit einem Kodak X-OMAT Film (Kodak) sichtbar gemacht werden. Alternativ wurden HeLa-S3-Zellextrakte (Präparation unter 2.3.10.2 beschrieben) anstelle der radioaktiv gelabelten Proteine für den Interaktionsassay genutzt. Die Detektion erfolgte hierbei über Immunoblotting-Experimente (wie unter 2.3.10.3 beschrieben).

2.3.16.9 *In vitro* poly(ADP-Ribosyl)ierung modifiziert nach Ferro & Olivera (1982) und deren Hemmung

Die Auto-(ADP-ribosylierung) von PARP-1 und die Modifikation von Substraten wurde von Niedergang *et al.* (1979) beschrieben. GST-TopBP1 (400 ng) und GST-TopBP1-BRCT6 (400 ng) wurden für 30 min bei 25°C mit 200 ng gereinigtem, rekombinanten PARP-1 (Merck) in einem Reaktionsansatz inkubiert. In diesem ebenfalls enthalten waren 50 µM Tris-HCL (pH8,0); 100 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 3 mg Kalbsthymus-DNA und 200 mM NAD⁺. Als Kontrolle diente GST (400 ng) allein und andere BRCT-Domänen-Konstrukte (z.B. GST-BRCT 1-2, jeweils 400 ng). Die ribosylierten Proteine wurden über SDS-PAGE und Immunoblotting-Experimente analysiert. Die Hemmung der poly-(ADP-ribosylierung) in HeLa-S3-Zellen wurde über den PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB, Sigma) realisiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors (3-10 mM) für 30 min. Danach wurden die Zellen mit UVB-Strahlung behandelt, geerntet, lysiert und wie unter 2.3.10.3 Immunoblotting-Experimenten zugeführt.

2.3.16.10 Zellfraktionierung und Chromatin-Isolation (nach Mendez und Stillmann, 2000)

Die Zellfraktionierung der zuvor transfizierten HeLa-Zellen erfolgte wie bei Mendez und Stillman, (2000) beschrieben. Um das Chromatin zu isolieren, wurden die geernteten Zellen (4×10^7) in Puffer A (10 mM HEPES; pH 7,9; 10 mM KCL; 1,5 mM MgCl₂; 0,34 M Saccharose; 10% Glyzerin; 1 mM DTT; 5 mg/ml Aprotinin; 5 µg/ml Leupeptin; 0,5 µg/l Pepstatin; 0,1 mM PMSF) aufgenommen. Triton X-100 (0,1%) wurde zugegeben und die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 1300xg und 4°C für 5 min, sodass die Zellkerne im Pellet (P1) sedimentierten. Der Überstand (S1) wurde mittels Zentrifugation bei 20000xg geklärt. Zelltrümmer und unlösliche Aggregate wurden dabei entfernt (S2). Die Zellkerne wurden 2x in Puffer A gewaschen und anschließend mit Hilfe des

Puffer B (3 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 1 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie oben beschrieben) lysiert. Das unlösliche Chromatin wurde durch Zentrifugation (4 min, 1700xg, 4°C) im Pellet gesammelt, der Überstand repräsentierte die lösliche nukleoplasmatische Fraktion (S3). Das Chromatin-Pellet wurde in Puffer B gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das finale Chromatin-Pellet wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und für 15 sec unter „low power“-Bedingungen des Labsonic U (Schütt Labortechnik) sonifiziert. Alle Fraktionen wurden über Western Blotting analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Das Topoisomerase II β Bindeprotein 1 (TopBP1) interagiert mit der Poly(ADP-Ribosyl)Polymerase (PARP-1)

TopBP1 ist in die DNA-Replikation und DNA-Reparaturprozesse involviert. Seine genaue biologische Funktion ist noch immer ungeklärt. Bekannt ist, dass eine der acht BRCT-Domänen Homologien mit der Auto(ADP-Ribosyl)ierungsdomäne des Proteins PARP-1 (Yamane *et al.*, 1997) zeigt (Abb.6). Zusätzlich weist sie teilweise Übereinstimmungen mit dem PAR-Bindemotiv auf, welches auch in anderen *checkpoint*-Proteinen vorhanden ist (Pleschke *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Tatsachen, wurde die Interaktion der 6. BRCT-Domäne mit der Automodifikationsdomäne angenommen.

Auch das Protein PARP-1 ist in oben genannte zelluläre Prozesse integriert. Die Interaktion von TopBP1 und PARP-1 wurde in Y. Wollmanns und in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. Mittels funktioneller Assays konnte die Bedeutung dieser Interaktion für die beschriebene Interaktion TopBP1-Miz1 (Herold *et al.*, 2002) in der hier vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

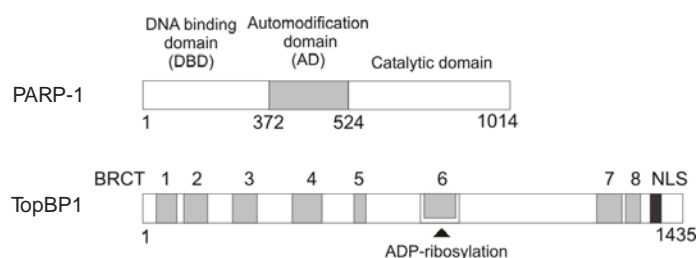
Für das bessere Verständnis werden ausgewählte Ergebnisse der Arbeit Y. Wollmanns ebenfalls dargestellt und entsprechend gekennzeichnet. Die folgenden Resultate wurden im *Journal of Cellular Biochemistry* 2007 Sep 1; 102(1):171-82 veröffentlicht.

3.1.2 PARP-1 interagiert mit der 6.BRCT-Domäne von TopBP1 *in vitro*

Zur Vervollständigung bereits vorhandener Daten wurde in einem GST-Pull-down-Experiment die Interaktion beider Gesamtlängenproteine überprüft. Die Expression des Gesamtprotein TopBP1 (aa1-1435) erfolgte als GST-Fusionsprotein in *E. coli* (Abb.6C). Die cDNA von PARP-1 (aa1-1014) stellte die Matritze für die *in vitro* Transkription/Translation dar.

Von Y. Wollmann konnte die Interaktion des PARP-1-Fragmentes, welches die DNA-Bindedomäne und Automodifikationsdomäne (aa1-524, PARP-1_(DBD-AD)) enthielt, mit GST-TopBP1-BRCT6 bzw. GST-TopBP1-BRCT6-8 gezeigt werden. Weiterhin lagen Ergebnisse von GST-Pull-down-Experimenten mit einem PARP-1-Fragment, welches nur die DNA-Bindedomäne (aa1-372, PARP-1_(DBD)) enthielt, und den beiden Fusionsproteinen GST-TopBP1-BRCT6 und GST-TopBP1-BRCT6-8 vor.

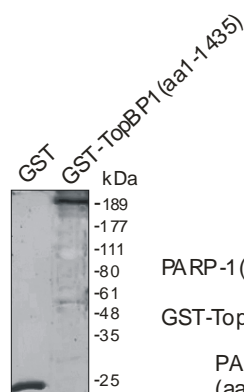
A.



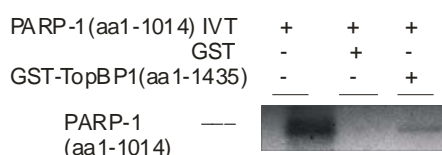
B.



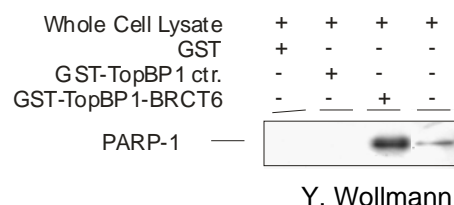
C.



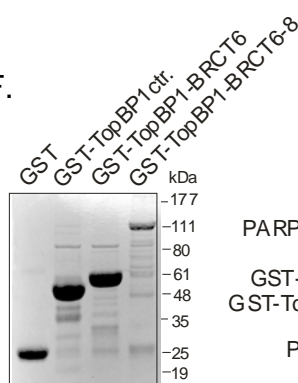
D.



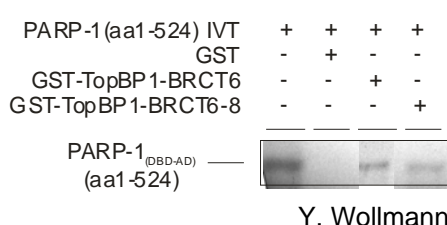
E.



F.



G.



H.

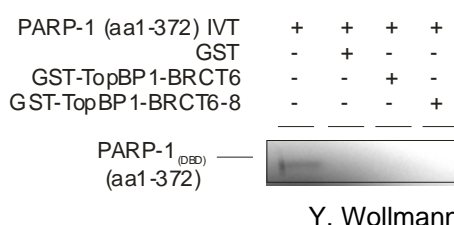


Abb.6: *in vitro* Interaktion von PARP-1 mit der 6.BRCT-Domäne von TopBP1

A: modulare Organisation von PARP-1 und TopBP1

B: Alignment der Peptidsequenz der 6.BRCT-Domäne mit dem PAR-Bindemotiv, welches in verschiedenen *checkpoint*-Proteinen vorkommt (Pleschke *et al.*; 2000)

C: GST und GST-TopBP1 (aa1-1435) wurden Coomassie-gefärbt

D: Resultate der GST-Pull-down-Experimente mit GST, GST-TopBP1 (aa1-1435) und [³⁵S]-markiertem PARP-1

E: Ergebnisse der GST-Pull-down-Experimente mit GST-TopBP1ctr. (aa935-1058), GST-TopBP1-BRCT6 und HeLa-Zelllysate; gebundenes PARP-1 wurde über Western blot-Analyse untersucht; Bahn 4: Input 10% des eingesetzten Zelllysates

F: GST, GST-TopBP1ctr., GST-TopBP1-BRCT6 (aa807-916), GST-TopBP1-BRCT6-8 (aa774-1320) wurden visualisiert mittels Coomassie-Färbung

G, H: Resultate der GST-Pull-down-Experimente mit GST, GST-TopBP1ctr., GST-TopBP1-BRCT6, GST-TopBP1-BRCT6-8 und [³⁵S]-markiertem PARP-1(DBD-AD) (aa1-524) (**G**) oder [³⁵S]-markiertem PARP-1(DBD) (aa1-372) (**H**)

1. Bahn: Input 10 µl des jeweils eingesetzten *in vitro* Translatats

Um die Interaktion von endogenem PARP-1 mit der aufgereinigten 6. BRCT-Domäne nachzuweisen, lag ein *Pull-down* mit HeLa-Zelllysate und GST-TopBP1-BRCT6 vor. Dabei wurde gebundenes endogenes PARP-1 über Western-Blot-Analyse mit einem PARP-1-Antikörper detektiert.

In allen GST-*Pull-down*-Experimenten fungierten GST bzw. GST-TopBP1ctr. als Kontrolle. Radioaktiv markiertes PARP-1-Gesamtprotein interagiert spezifisch mit GST-TopBP1 (Abb.6D). Sowohl die 6. BRCT-Domäne (GST-TopBP1-BRCT6) von TopBP1 als auch das TopBP1-Fragment BRCT6-8 (GST-TopBP1-BRCT6-8) interagierten mit PARP-1_(DBD-AD), nicht aber mit PARP-1_(DBD) (Abb.6G, H).

Mittels GST-*Pull-downs* mit HeLa-Zelllysaten, konnte die Interaktion von endogenem PARP-1 mit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 gezeigt werden (Abb.6E).

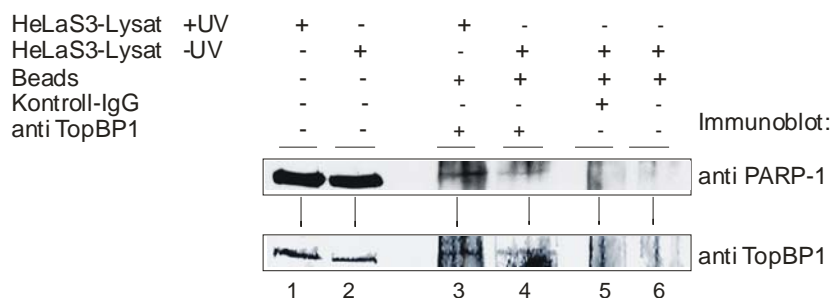
Zusammenfassend lässt sich folgendes aus diesen Experimenten schließen:

Die Proteine TopBP1 und PARP-1 interagierten *in vitro* miteinander. Die 6. BRCT-Domäne des Proteins TopBP1 war hinreichend für die Interaktion mit PARP-1. Die PARP-1-Region, die die DNA-Bindedomäne und die Automodifikationsdomäne enthielt, genügte für die Bindung an TopBP1.

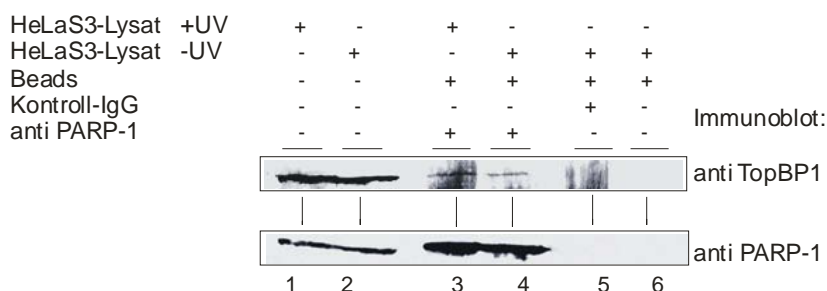
3.1.3 PARP-1 und TopBP1 interagieren *in vivo*

Neben den ergänzenden *in vitro* Studien, wurde die Interaktion der endogenen Proteine TopBP1 und PARP-1 *in vivo* vollständig neu untersucht. HeLa-S3-Zelllysate wurden hierfür mit anti-TopBP1- bzw. anti-PARP-1-Antikörpern coimmunopräzipitiert. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte über Immunoblotting. Zum einen wurden Anti-TopBP1-Antikörper an μ MACS ProteinG-Beads gebunden und copräzipitiertes PARP-1 detektiert (Abb.7A). Zum anderen erfolgte die Bindung von PARP-1-Antikörpern an ProteinA/G-Agarose, in deren Anschluss die Detektion der copräzipitierten Proteine stattfand (Abb.7B). Um die Bindung der Proteine näher zu charakterisieren, wurden die Präzipitationsexperimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. So erfolgte vor der Ernte und Lyse von HeLa-S3-Zellen bei einem Teil der Zellen eine UVB-Behandlung, die DNA-Strangbrüche verursachte. Mit dem anderen Teil der Zellen erfolgten die Präzipitationsexperimente ohne UVB-Einwirkung.

A.



B.

**Abb.7: PARP-1 assoziiert mit TopBP1 *in vivo***

Unbehandelte HeLa-S3-Zellen und Zellen, die zuvor UVB-Strahlung ausgesetzt waren (15min; 250 J/m²) wurden coimmunopräzipitiert

A: anti-TopBP1-Antikörper wurden an μ MACS ProteinG-Beads gebunden

B: anti-PARP-1-Antikörper wurden an ProteinA/G-Agarose-Beads gebunden

Als Kontrolle wurden die Beads allein bzw. ein Kontroll-Antikörper eingesetzt.

Die Präzipitate wurden mittels Immunoblotting-Experimenten analysiert.

Input (Bahnen 1 u. 2): jeweils 20% der für die Coimmunopräzipitation eingesetzten Zelllysatsmengen

Den Abbildungen 7A und B ist zu entnehmen, dass TopBP1 und PARP-1 *in vivo* miteinander interagierten. Nach der Behandlung mit UVB-Strahlen verstärkte sich diese Interaktion in gewissem Umfang, was in einer geringfügig stärkeren Bande des jeweils copräzipitierten Proteins auf den oben gezeigten Blots (Abb.7A, Bahn 3; Abb.7B, Bahn 3) erkennbar ist.

3.1.4 Die zelluläre Verteilung von PARP-1 und TopBP1 in HeLa-S3-Zellen

Eine Überprüfung der räumlichen Verteilung der endogenen Proteine TopBP1 und PARP-1 in HeLa-S3-Zellen unter verschiedenen Bedingungen erfolgte mittels Immunfluoreszenz.

HeLa-S3-Zellen wurden dazu auf Objektträgern gezüchtet. Zellen, die einer UVB-Strahlung ausgesetzt waren, wurden 10, 20 und 60 min nach der Behandlung fixiert. Über Immunfluoreszenzfärbung wurden sie im Vergleich zu unbehandelten Zellen hinsichtlich der zellulären Verteilung der Proteine betrachtet (Abb.8).

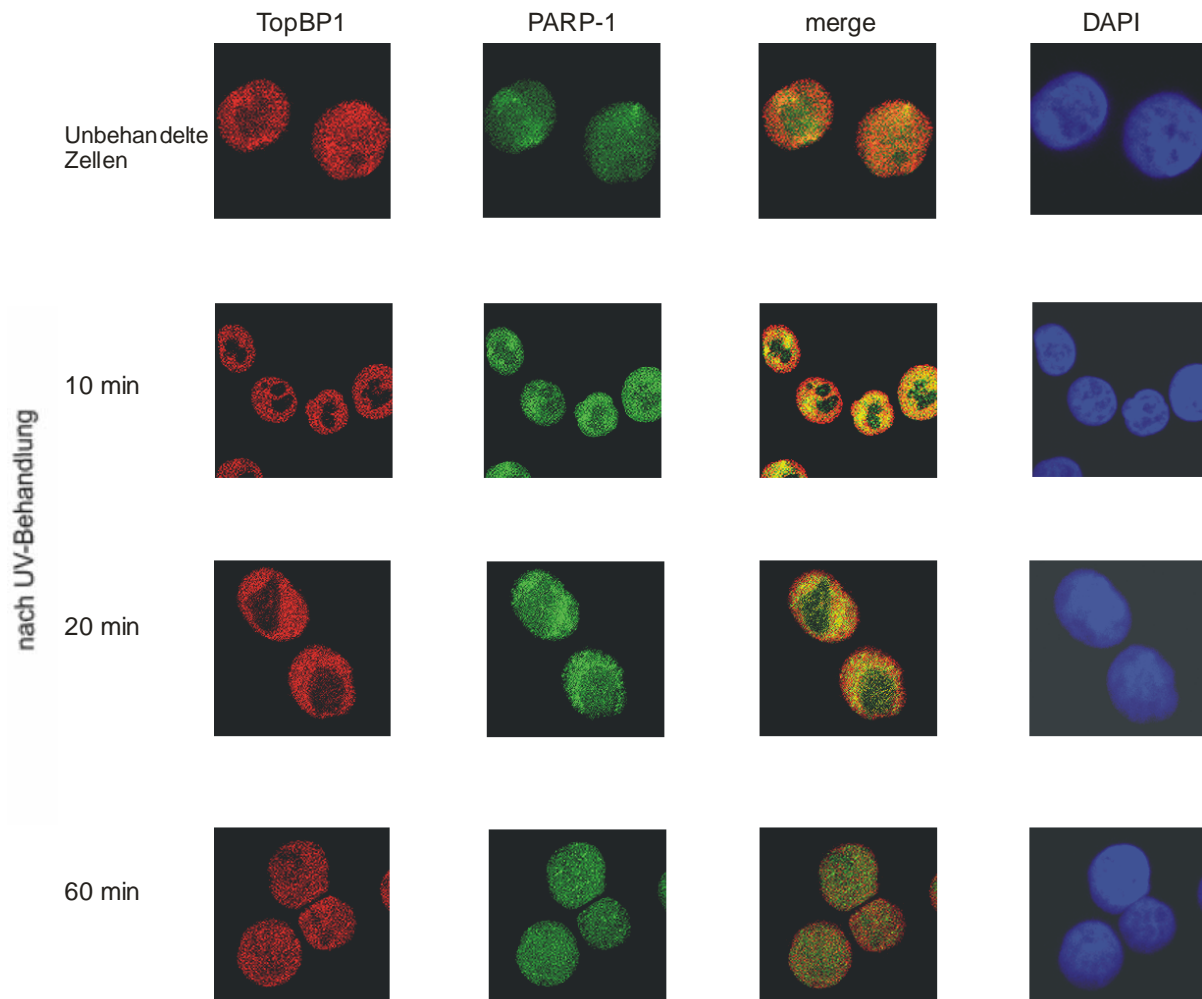


Abb.8: TopBP1 und PARP-1 sind in überlappenden Regionen des Zellkerns von HeLa-S3-Zellen zu finden

Immunfluoreszenzfärbungen von endogenem TopBP1 und PARP-1

HeLa-S3-Zellen (unbehandelt und zu bestimmten Zeiten nach UVB-Behandlung von 250J/m^2 geerntet) wurden fixiert und mittels anti-TopBP1 (rot), anti-PARP-1 (grün) und DAPI (blau) fluoreszenzmarkiert

merge: gelbe Bereiche zeigen die Lokalisation von TopBP1 und PARP-1 in überlappenden Regionen in Zellkernen von HeLa-S3-Zellen

Anhand der Abb.8 ist zu erkennen, dass sowohl TopBP1 als auch PARP-1 ausschließlich im Zellkern (Nukleolus) und nicht im Cytoplasma vorkamen. In den Kernkörperchen (Nukleoli) schien, wenn auch sehr geringfügig, das Protein PARP-1, nicht aber TopBP1 aufzutreten.

In unbehandelten HeLa-S3-Zellen gab es nur wenig Bereiche, in denen die Proteine in überlappenden Regionen (merge) vorkamen. In den UVB-behandelten Zellen hingegen, fand man 10 min nach der Bestrahlung weitreichende Areale, die eine Überlagerung beider Proteine aufwiesen. Auch 20 min nach der UVB-Behandlung ließen sich unzählige Überlappungen nachweisen, die aber 60 min nach der Behandlung fast vollständig verschwunden waren.

Die Immunfluoreszenzexperimente zeigten, dass TopBP1 und PARP-1 nukleäre Proteine sind, die in überlappenden Regionen des Zellkerns vorkommen.

3.1.5 TopBP1 wird von PARP-1 ADP-ribosyliert

Aufgrund der Homologien zwischen der 6.BRCT-Domäne von TopBP1 und der Auto(ADP-ribosyl)ierungsdomäne von PARP-1, sollte geprüft werden, inwieweit TopBP1 *in vivo* und *in vitro* ADP-ribosyliert wird. Als erstes wurde getestet, ob unter den erstellten experimentellen Bedingungen eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung *in vivo* stattfindet. Dafür wurde mittels eines Poly(ADP-Ribose(PAR))-Antikörpers die PAR-Synthese der unbehandelten und UVB-behandelten HeLa-S3-Zellen in Immunfluoreszenzexperimenten detektiert (Abb.9).

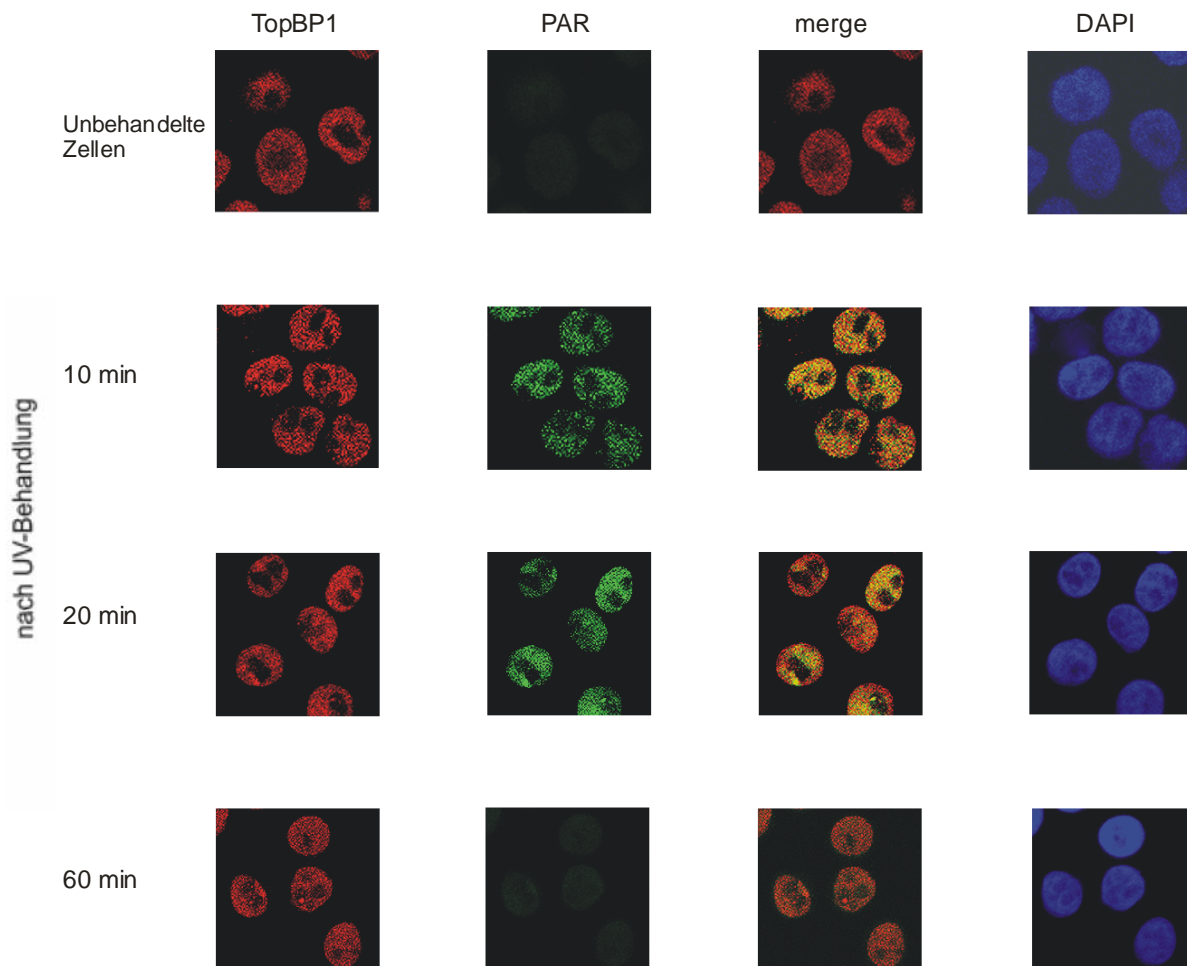


Abb.9: TopBP1 ist in nukleären Regionen zu finden, in denen Poly(ADP-Ribose(PAR)) lokalisiert ist

Immunfluoreszenzfärbungen von endogenem TopBP1 und PAR

HeLa-S3-Zellen (unbehandelt und zu bestimmten Zeiten nach UVB-Behandlung von 250J/m^2 geerntet) wurden fixiert und mittels anti-TopBP1 (rot), anti-PAR (grün) und DAPI (blau) fluoreszenzmarkiert

merge: gelbe Bereiche zeigen die Lokalisation von TopBP1 und PAR in überlappenden Regionen in Zellkernen von HeLa-S3-Zellen

Poly(ADP-Ribose) war, wie in der Abbildung 9 zu erkennen ist, sowohl in unbehandelten Zellen als auch 60 min nach der UVB-Behandlung weder in den Zellkernen, noch im Zytoplasma detektierbar. 10 min und 20 min nach der UV-Behandlung der Zellen, konnte die PAR-Synthese in den Zellkernen deutlich detektiert werden. Neben der PAR- wurde auch die TopBP1-Verteilung in den Zellen betrachtet. Auch hier konnte eine eindeutig nukleäre Lokalisation festgestellt werden. Überlappende Bereiche von PAR und TopBP1 in den Zellkernen konnten vor allem 10 min nach der UVB-Behandlung wahrgenommen werden. 20 min nach der Behandlung waren deutlich weniger regionale Übereinstimmungen von PAR und TopBP1 zu erkennen. Diese Daten lassen auf eine *in vitro* Poly(ADP-Ribosyl)ierung schließen.

Ausgehend von diesen Resultaten wurde in Poly(ADP-Ribosyl)ierungsexperimenten versucht, TopBP1 *in vitro* zu ribosylieren. Das Gesamtlängen-Protein TopBP1 und die 6. BRCT-Domäne von TopBP1 wurden mit GST fusioniert, in *E. coli* aufgereinigt und in einem Reaktionsansatz mit rekombinantem PARP-1, NAD^+ und genickter DNA inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung, Western blotting und Detektion der im Reaktionsansatz enthaltenen Proteine.

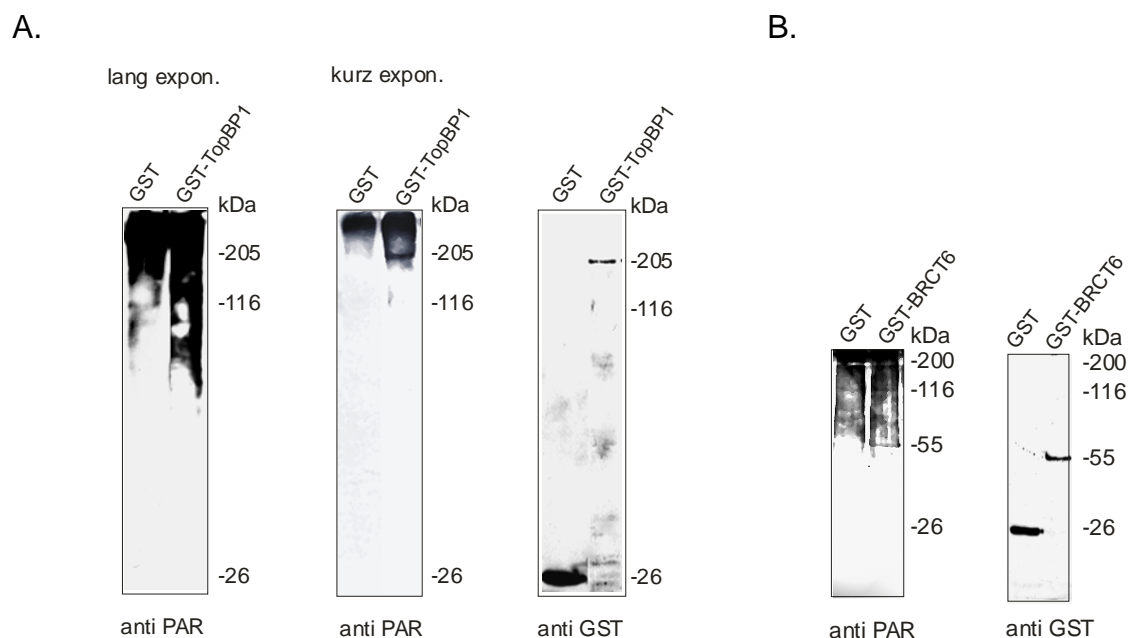


Abb.10: TopBP1 wird von PARP-1 modifiziert

800 ng GST-TopBP1 (aa1-1435) (A) bzw. GST-BRCT6 (aa807-916) (B) und GST, 200 ng PARP-1, 200 μM NAD^+ wurden 30 min bei 25°C inkubiert

A: GST-TopBP1 (aa1-1435)

links: Immunoblot anti-PAR; rechts: Immunoblot anti-GST

B: GST-BRCT6 (aa807-916)

links: Immunoblot anti-PAR; rechts: Immunoblot anti-GST

Unter Verwendung des PAR-Antikörpers konnten im Ribosylierungsversuch des Gesamtproteins TopBP1 Protein-Banden auf gleicher Höhe, wie die mittels GST-tag-Antikörper erzeugten, detektiert werden (Abb.10A). Die Höhe beider Banden lag bei 205 kDa. Aufgrund der sehr intensiven Signale der PAR und somit der Ribosylierungsreaktion, wurden zwei unterschiedliche Expositionszeiten der Immunoblots gezeigt (Abb.10A). Auch für das GST-TopBP1-BRCT6-Fragment ließen sich übereinstimmende Banden für PAR und GST-tag bei 55 kDa detektieren (Abb.10B). Die GST-Kontrolle zeigte in keinem der Versuche Ribosylierungszeichen.

Aus den Immunfluoreszenzexperimenten und den ADP-Ribosylierungsversuchen lässt sich schließen, dass das Gesamtprotein TopBP1 bzw. die 6. BRCT-Domäne dieses Proteins durch PARP-1 poly(ADP-ribosyl)iert werden.

3.1.6 Die zelluläre Poly(ADP-ribosyl)ierungsaktivität verhindert die Bindung von TopBP1 an Miz1

Das Protein Miz1 bindet an die 7. BRCT-Domäne von TopBP1 (Herold *et al.*, 2002), in deren unmittelbarer Nachbarschaft die Oligo(ADP-ribosyl)ierungsregion von TopBP1 vorliegt. Es wurde gezeigt, dass Miz1 als Antwort auf DNA-Schädigungen aus dem Komplex mit TopBP1 entlassen wird (Herold *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis, dass TopBP1 poly(ADP-ribosyl)iert wird. Inwieweit dies Einfluss auf die Miz1-Bindung hat, sollte die Untersuchung UVB-bestrahlter Zellen zeigen.

Miz1 wurde als GST-Fusionsprotein in *E.coli* aufgereinigt. In einem anschließenden GST-*Pull-down* mit HeLa-Zellextrakt, sollte zunächst die Bindung von endogenem TopBP1 an GST-Miz1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden UVB-bestrahlte HeLa-Zellen lysiert und der Extrakt in einem weiteren GST-*Pull-down*-Experiment mit GST-Miz1 verwendet. Wie der Abb.11, Bahn 3 zu entnehmen ist, lag Miz1 in unbehandelten Zellen in einem Komplex mit TopBP1 vor. Dieser Komplex löste sich nach der Behandlung mit UVB-Strahlung auf (Abb.11, Bahn 4). Um zu prüfen, ob dieser Vorgang im Zusammenhang mit der TopBP1-Poly(ADP-ribosyl)ierung steht, wurde der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) genutzt, um die PARP-1-Aktivität und damit die Ribosylierung von TopBP1 zu unterbinden. HeLa-Zellen wurden hierfür mit 3-AB behandelt und im Anschluss UVB-Strahlung ausgesetzt.

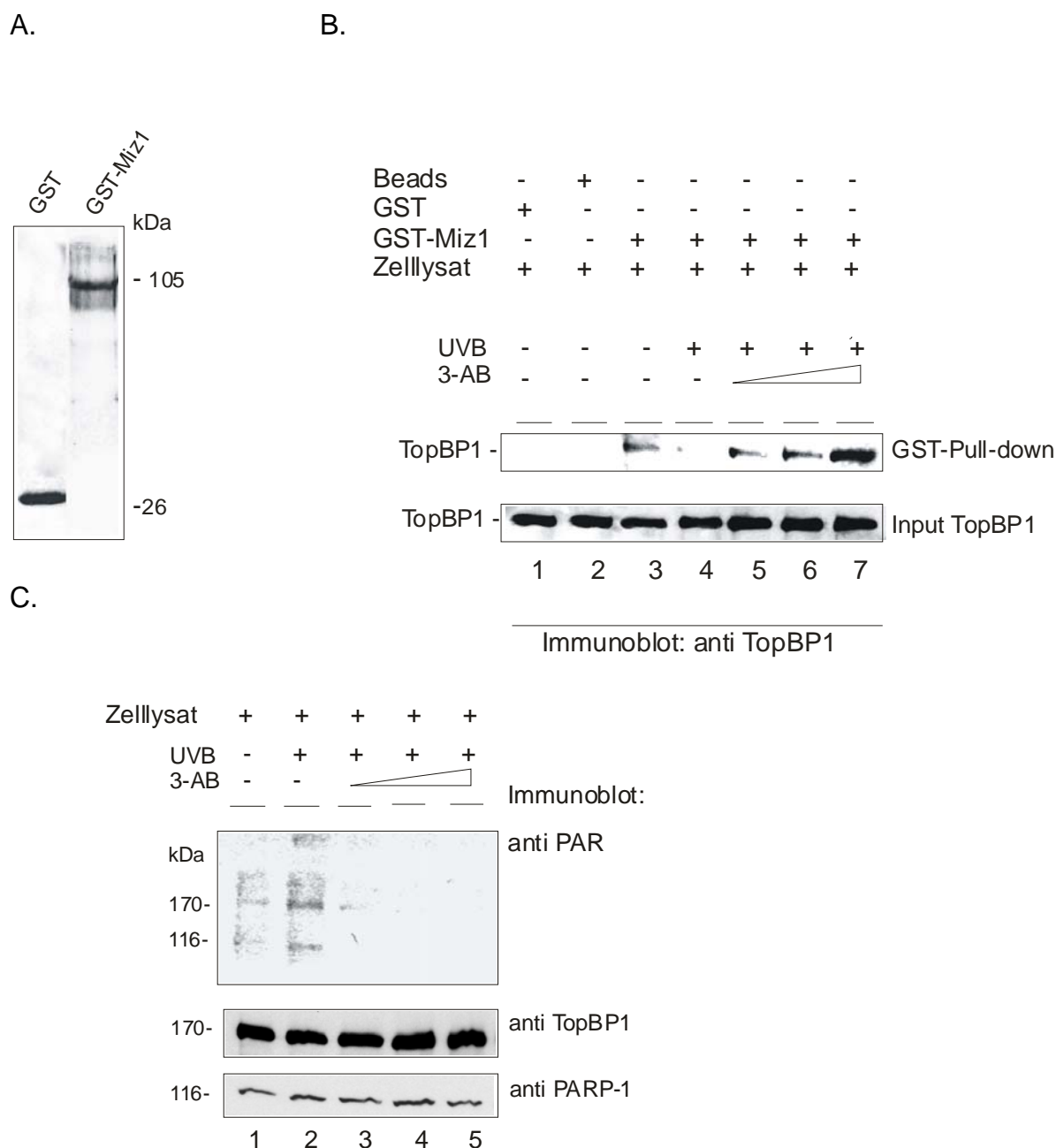


Abb.11: UVB-Behandlung von HeLa-S3-Zellen beeinträchtigt die Bindung von TopBP1 und Miz1

A: GST und GST-Miz1 wurden aufgereinigt und Coomassie-gefärbt

B: Ergebnisse der GST-Pull-down-Experimente; GST-Miz1, GST (Kontrolle) wurden mit HeLa-S3-Zelllysaten inkubiert (Bahnen 1-3: unbehandelte Zellen; Bahn 4: Zellen, 20 min nach UVB-Behandlung von 250 J/M²; Bahnen 5-7: Zellen, die 30 min vor der UVB-Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen 3-AB, 3, 5 und 10 mM, versetzt und 20 min nach UVB-Behandlung von 250 J/M² lysiert wurden)

Gebundene Proteine wurden mittels Western blot-Analysen und TopBP1-Antikörpern untersucht; Input: 50% (65 µg Protein) der eingesetzten Proteinmenge

C: HeLa-S3-Zelllysate (65 mg Protein) (Bahn 1: unbehandelte Zellen; Bahn 2: Zellen, 20 min nach UVB-Behandlung von 250 J/M²; Bahnen 3-5: Zellen, die 30 min vor der UVB-Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen 3-AB, 3, 5 und 10 mM, versetzt und 20 min nach UVB-Behandlung von 250 J/M² lysiert wurden)

Gebundene Proteine wurden über Western blot analysiert, die Membran mit PAR-, PARP-1- und TopBP1-Antikörpern behandelt

In Abb.11C sieht man die Wirkung von 3-AB auf die PARP-1-Ribosylierungsaktivität. Das Enzym PARP-1 zeigte sich mit steigender Konzentration des Inhibitors 3-AB und der UVB-Einwirkung in seiner Konzentration in den Zellen unverändert. Auch der TopBP1-Anteil schien in den Zellen unter den gegebenen Bedingungen konstant zu sein.

PAR als Maß für die PARP-1-Ribosylierungsaktivität (nach der Erzeugung von DNA-Strangbrüchen) hingegen konnte mit steigenden 3-AB-Konzentrationen nicht mehr detektiert werden (Abb.11C, Bahnen 3-5). Der Beleg für die Wirkung des Inhibitors 3-AB war somit erbracht.

Dass die Hemmung der PARP-1-Aktivität Auswirkungen auf das Verschwinden des TopBP1-Miz1-Komplexes hatte, kann man der Abb.11B entnehmen. Die Bahnen 5-7 zeigen, dass sich die Bindung von TopBP1 an Miz1 wiederherstellen ließ, indem die PARP-1-Aktivität inhibiert wurde. Mit steigenden Konzentrationen von 3-AB verstärkte sich das TopBP1-Signal und somit die Menge an TopBP1, welche nunmehr wieder an Miz1 binden konnte.

Die Experimente belegen sehr deutlich, dass die Hemmung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität, die Interaktion von Miz1 und TopBP1 wiederherstellte.

3.2 Charakterisierung der Interaktion zwischen dem humanen Topoisomerase II β -Bindeprotein (TopBP1) und dem *Cell division cycle protein 45* (Cdc45)

In welchem Maß sich die TopBP1-Expression und -Bindung an Chromatin im Verlauf des Zellzyklus verändert, konnte von Y. Wollmann gezeigt werden (siehe 1.2.6). Die TopBP1-Konzentration in den untersuchten Zellen war zu Beginn der S-Phase sehr hoch und nahm im Verlauf des Zellzyklus in Richtung G2/M-Übergang stark ab. Zudem kann die replikative DNA-Synthese mit neutralisierenden Antikörpern gegen DNA Polymerase α und ϵ ebenso gehemmt werden, wie mit einem TopBP1-Antiserum (Pospiech *et al.*, 1999; Mäkinen *et al.*, 2001). Aus diesen Daten ließ sich postulieren, dass humanes TopBP1 ähnlich seinen Homologen Dpb11 (Rad4/Cut5) in Hefen bzw. Xmus101/cut5 in *Xenopus* ebenfalls eine Rolle bei der Replikation der DNA übernimmt. Dpb11 und Xmus101/cut5 interagieren mit Cdc45 (Kamimura *et al.*, 1998, van Hatten *et al.*, 2002, Hashimoto & Takisawa, 2003). Cdc45 ist wesentlich für die Initiation der eukaryotischen Replikation (Zou *et al.*, 1997, Mimura & Takisawa, 1998, Mimura *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Datenlage wurde angenommen, dass eine Interaktion der beiden humanen Proteine TopBP1 und Cdc45 nicht auszuschließen ist. Dies zu überprüfen bedurfte vielfältiger Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*. Erste Vorarbeiten von Y. Wollmann zeigten, dass beide Proteine *in vivo* mittels

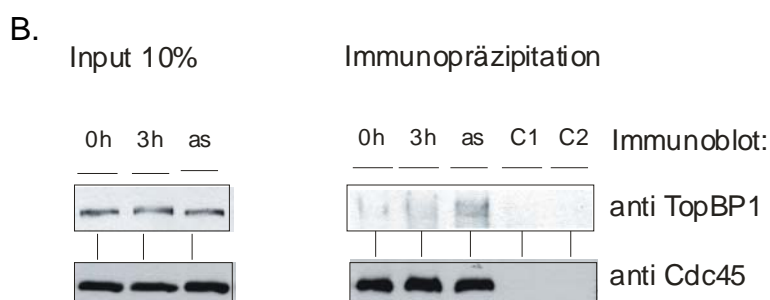
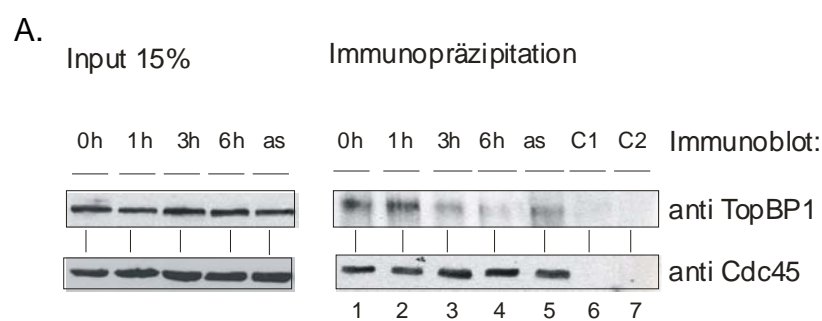
Coimmunopräzipitation aus HeLa-Zellextrakten gefällt werden konnten. Auch erste GST-*Pull-down*-Experimente wiesen auf eine Interaktion *in vitro* hin, die allerdings nicht eindeutig belegt werden konnte (siehe 1.2.7)

Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse wurden im *Biochemical Journal* 2008 Jan 1; 409(1):169-77 veröffentlicht.

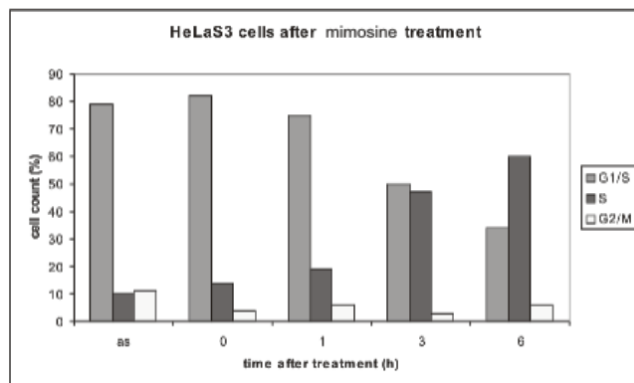
3.2.1 TopBP1 und Cdc45 interagieren *in vivo* ausschließlich am G1/S-Übergang des Zellzyklus

Damit die Wechselwirkung der humanen Proteine TopBP1 und Cdc45 in frühen und späten Phasen des Zellzyklus erforscht werden konnte, wurden HeLa-S3-Zellen am G1/S-Übergang mittels Mimosin bzw. in der sehr frühen S-Phase mittels doppelten Thymidinblock oder am G2/M-Übergang mit Nocodazol synchronisiert. Über FACS-Analysen der synchronisierten Zellen erfolgte der Nachweis der Synchronisation (Abb.12C und D).

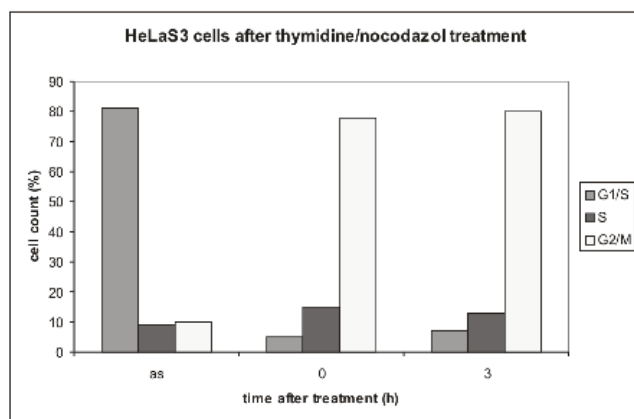
Zellextrakte synchronisierter Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entlassen aus dem Mimosin-Block (G1/S-Übergang) gewonnen. Mit Hilfe eines anti-Cdc45-Antikörpers erfolgten anschließend Coimmunopräzipitationsexperimente. Die präzipitierten Proteine wurden über Western blot-Analysen gesichtet. Wie in Abb.12A, Bahnen 1 und 2 gezeigt, konnte endogenes TopBP1 zusammen mit Cdc45 direkt am Übergang G1/S-Phase und eine Stunde nach Entlassen aus dem Mimosin-Block erfolgreich copräzipitiert werden. Zu späteren Zeiten (3 h und 6 h), als sich bereits mehr als die Hälfte der Zellpopulation in der S-Phase befand, sank die Effektivität der Copräzipitation dramatisch.



C.



D.



E.

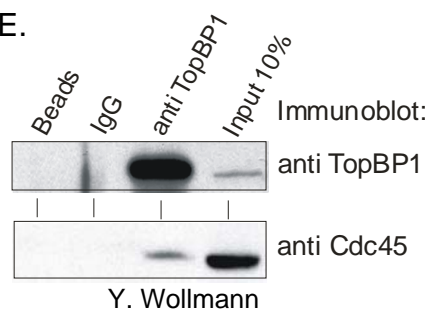


Abb.12: TopBP1 und Cdc45 interagieren *in vivo* ausschließlich am G1/S-Übergang des Zellzyklus

Gesamtzelllysate synchronisierter HeLa-S3-Zellen wurden gewonnen:

A: am G1/S-Übergang nach Mimosin (0,3 mM)-Synchronisation

B: am G2/M-Übergang nach Thymidin/Nocodazol (100 ng/ml)-Synchronisation

E: in der frühen S-Phase nach doppeltem Thymidinblock (5 mM)

Lysate (800 µg) wurden zu verschiedenen Zeiten nach dem jeweiligen Block für die Coimmunopräzipitation, die mit Antikörpern gegen Cdc45 (A, B) bzw. TopBP1 (E) erfolgte, geerntet. Als Kontrolle wurden Beads allein (C1) oder an Beads-gekoppelte nicht relevante Antikörper (anti FADD) bzw. Prä-Immuneserum eingesetzt (C2).

Nichtsynchronisierte Zellen dienten als Kontrolle (as).

Input: 20% der für die Coimmunopräzipitation eingesetzten Lysatmenge

C, D: Die Zellsynchronisationen wurden über Flowcytometrie (FACS) überprüft.

Die Präzipitat-Analysen erfolgten mittels Immunoblotting-Experimenten mit Antikörpern gegen TopBP1 und Cdc45.

Mit Nocodazol behandelte Zellen (G2/M-Übergang) wurden ebenfalls lysiert und die Lysatproteine coimmunopräzipitiert. Endogenes TopBP1 konnte in diesen Zellen mittels anti-Cdc45-Antikörper bestenfalls geringfügig copräzipitiert werden (Abb.12B, Bahnen 1 und 2). *Vice versa* wurden anti-TopBP1-Antikörper an Agarose-Beads gebunden. Mit ihnen konnten sowohl TopBP1 als auch Cdc45 in HeLa-S3-Zellen gefällt werden, die 3 h nach dem Entlassen aus einem doppelten Thymidinblock geerntet und lysiert wurden (Abb.12E). Die Immunopräzipitationsstudien zeigten, dass TopBP1 und Cdc45 *in vivo* überwiegend am G1/S-Übergang des Zellzyklus einen stabilen Protein-Protein-Komplex bilden.

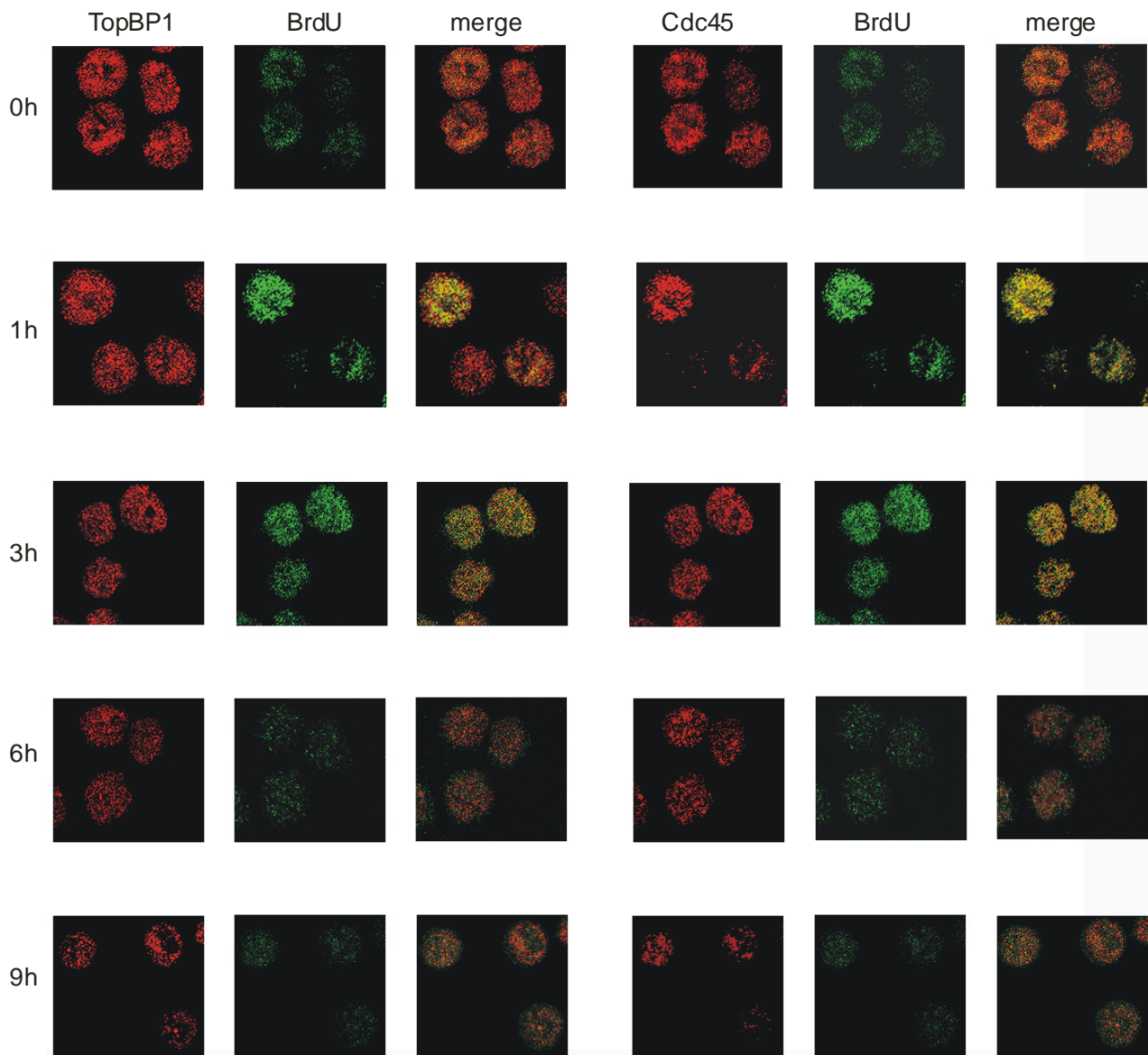
Die in Abb.13A und B gezeigten Immunfluoreszenzbilder unterstützen die oben dargestellten Coimmunopräzipitationsexperimente. HeLa-S3-Zellen wurden am Übergang G1/S-Phase arretiert, aus dem TdR-Block entlassen und auf Objektträgern fixiert. Direkt nach dem Entlassen erfolgte für 15 min die BrdU-Behandlung der Zellen, die es im Anschluss mittels BrdU-Antikörper ermöglichte, Orte der DNA-Synthese sichtbar zu machen.

Es schlossen sich Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung der Antikörper anti-TopBP1, anti-Cdc45, anti-BrdU und DAPI an. So wurde überprüft, inwieweit die Proteine TopBP1 und Cdc45 in überlappenden Regionen mit BrdU und damit an den Orten der DNA-Synthese zu finden sind. Auch die Colokalisation von TopBP1 und Cdc45 konnte so näher beleuchtet werden.

Direkt nach dem Entlassen (0 h) konnten weder TopBP1, noch Cdc45 an DNA-Synthese-Orten gefunden werden. Nach einer Stunde, also direkt zu Beginn der S-Phase, waren sowohl TopBP1 als auch Cdc45 an Orten der DNA-Synthese lokalisiert. Diese Colokalisation mit BrdU wurde für Cdc45 auffälliger als für TopBP1 verzeichnet. Drei Stunden nach dem Entlassen aus dem TdR-Block, einem Zeitpunkt zu dem die Zellen vollständig in die S-Phase eingetreten waren, sah man die deutliche Übereinstimmung von Cdc45- und BrdU-Regionen, jedoch nur noch wenige Bereiche einer TopBP1-BrdU-Überlappung. Nach 6 h und 9 h colokalisierten weder TopBP1 noch Cdc45 mit Orten der DNA-Synthese.

Bei einer Überprüfung der Lokalisationen von TopBP1 und Cdc45 wurde deutlich, dass beide Proteine einzig in der späten G1- und frühen S-Phase in übereinstimmenden Bereichen zu finden waren. Bereits drei Stunden nach dem Entlassen aus dem Block konnten kaum noch überlappende Bereiche verzeichnet werden. Zu späteren Zeiten (6 h, 9 h) wurde keine Colokalisation von TopBP1 und Cdc45 mehr detektiert.

A.



B.

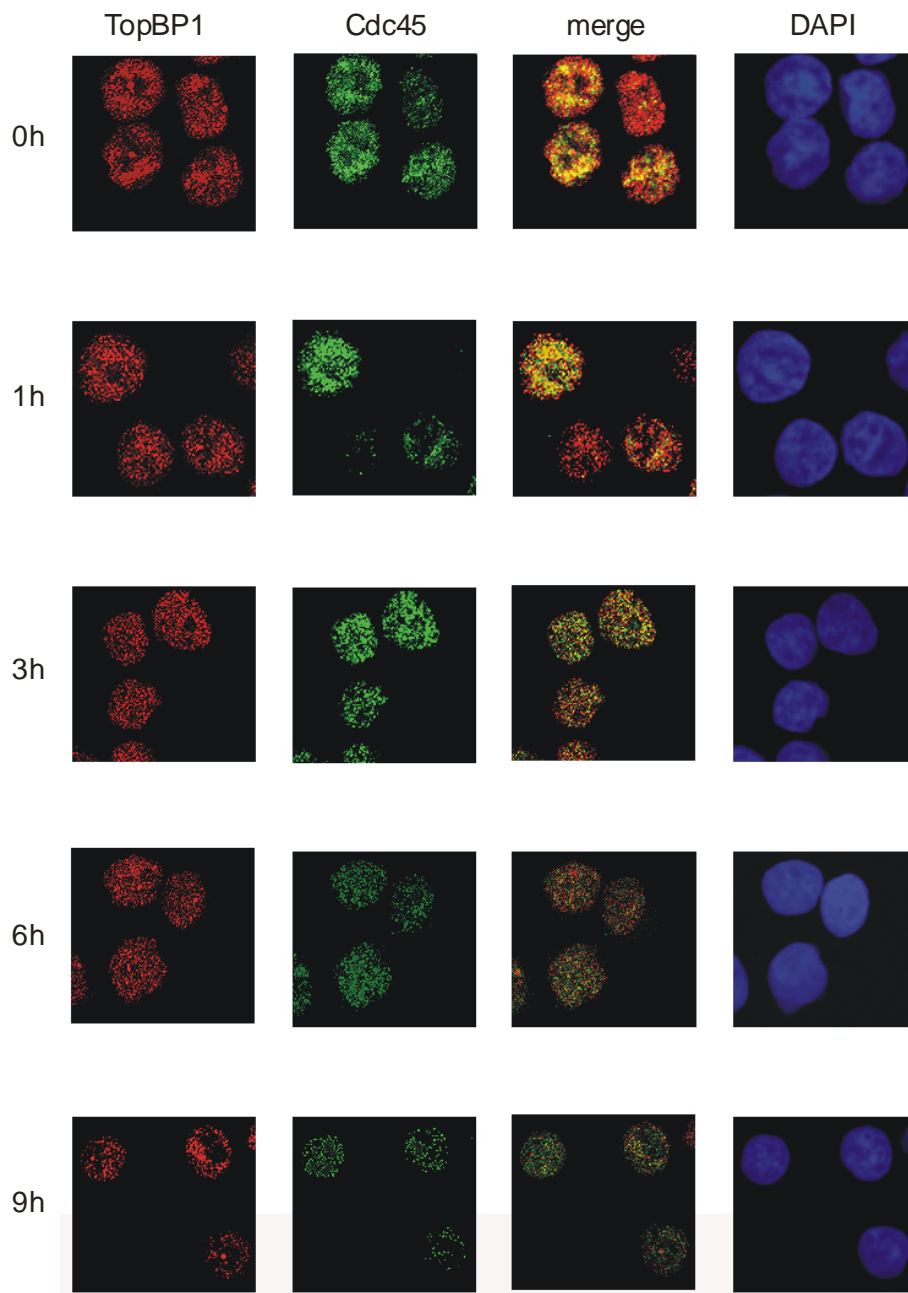


Abb.13: *In vivo* Lokalisation von TopBP1 und Cdc45 in synchronisierten HeLa-S3-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen aus dem TdR-Block

A: TopBP1 und Cdc45 colokalisieren mit Regionen von BrdU. Synchronisierte HeLa-S3-Zellen wurden fixiert und zunächst mit spezifischen Antikörpern gegen TopBP1, Cdc45 und BrdU und anschließend mit Rhodamine X-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy5-konjugiertem Ziege anti-Ratte IgG oder Fluorescein-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG behandelt.

merge: gelbe Punkte stellen überlappende Regionen von TopBP1 oder Cdc45 einerseits und BrdU andererseits dar

B: TopBP1 und Cdc45 colokalisieren am G1/S-Übergang. Synchronisierte HeLa-S3-Zellen wurden fixiert und immunfluoreszenz-markiert mittels oben genannter Antikörper
merge: gelbe Punkte stellen überlappende Regionen von TopBP1 und Cdc45 dar. Die DNA-Färbung, erfolgt mit DAPI, demonstriert die Position der Zellkerne.

3.2.2 TopBP1 und Cdc45 interagieren *in vitro*

Ob TopBP1 und Cdc45 *in vitro* direkt interagieren, sollte mit Hilfe von GST-Pull-down-Experimenten geprüft werden. Cdc45 wurde als GST-Fusionsprotein aufgereinigt und mit [³⁵S]-markiertem Gesamtlängen-TopBP1 inkubiert. Die Analyse der Bindung erfolgte über 10%ige SDS-PAGE und Autoradiographie.

Wie in Abb.14B (Bahn 5) gezeigt, wurde TopBP1 spezifisch von GST-Cdc45 gebunden. Dies wies auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine hin. Das Protein Cdc45 scheint keine charakteristischen Domänen zu besitzen, aber ein zentraler Bereich des humanen Proteins Cdc45 weist signifikante Homologien zum Protein E1 des humanen Papillomavirus auf (Kukimoto *et al.*, 1999).

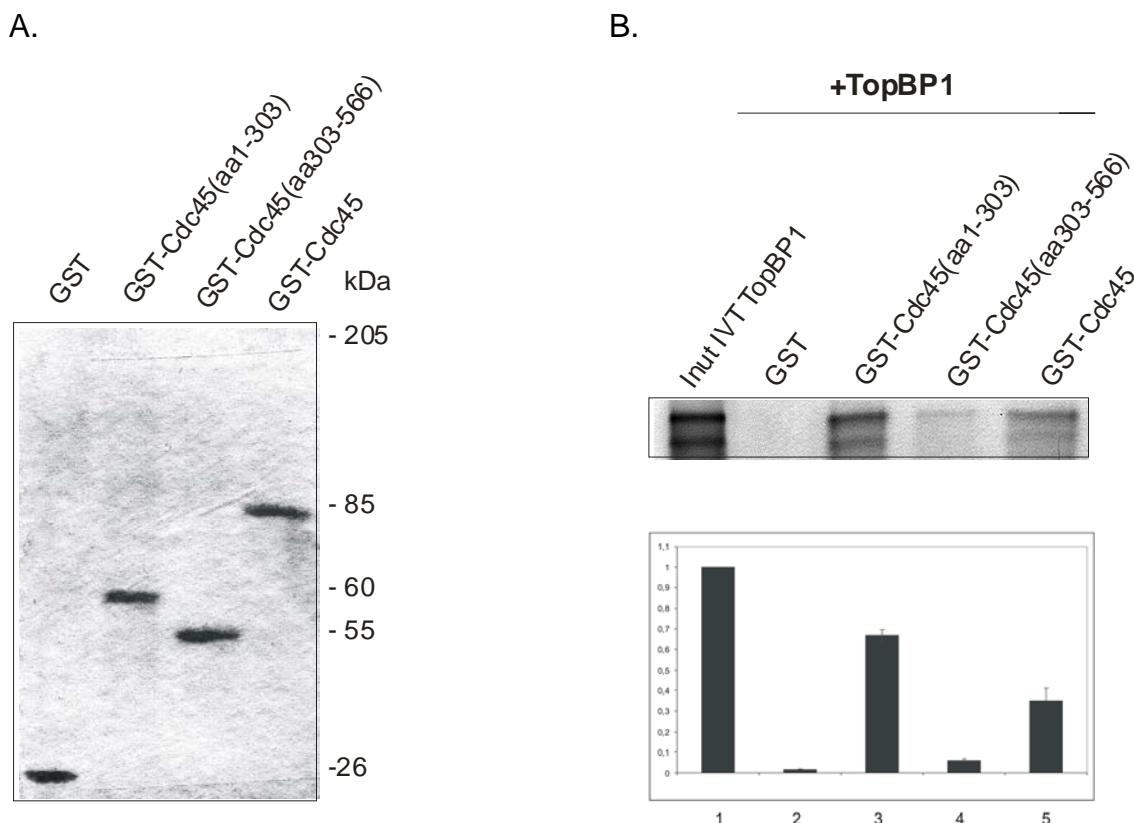


Abb.14: TopBP1 interagiert mit dem N-terminalen Teil von Cdc45

A: Coomassie-Färbung GST, GST-Cdc45(aa1-303), GST-Cdc45(aa304-566)

B: Resultate des GST-Pull-down-Assays mit Cdc45(aa1-566) (Bahn 5), N- und C-terminale Fragmente von Cdc45 (Bahnen 3 und 4) und GST (Bahn 2) als Kontrolle

TopBP1 wurde über Autoradiographie detektiert. Input: 20% (Bahn 1)

B unterer Teil: Quantifizierung der GST-Pull-down-Assays;

Input wurde 1 gleichgesetzt

So wurden für den Einsatz in GST-*Pull-down*-Experimenten zwei GST-getaggte Teilkonstrukte geschaffen, um die TopBP1-Interaktionsdomäne von Cdc45 einzuengen: a) ein N-terminales Konstrukt, welches die E1-homologe Domäne enthielt (aa1-303) und b) ein C-terminales Konstrukt (aa304-566) (Abb.14A). In Abb.14B, Bahnen 3 und 4 ist gezeigt, dass TopBP1 spezifisch mit dem N-terminalen Teilkonstrukt interagiert. Die Bindungseffizienz war relativ hoch. Über 70% des eingesetzten TopBP1 band an GST-Cdc45(aa1-303) (Abb.14B, unterer Teil).

Aus den gezeigten Resultaten ist erkennbar, dass TopBP1 *in vitro* mit dem N-Terminus des Proteins Cdc45 interagiert.

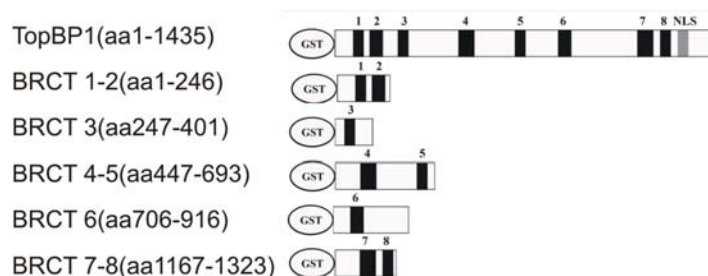
3.2.3 Cdc45 interagiert *in vitro* mit der 1. und 2. BRCT-Domäne ebenso wie mit der 6. BRCT-Domäne

Humanes TopBP1 beinhaltet acht BRCT-Domänen. Um herauszufinden, welche dieser Domänen in die Interaktion mit Cdc45 involviert ist, wurden verschiedene GST-getaggte TopBP1-Fragmente in *E. coli* aufgereinigt. Sie wurden in GST-*Pull-down*-Experimenten auf ihre Interaktion mit Cdc45 hin untersucht.

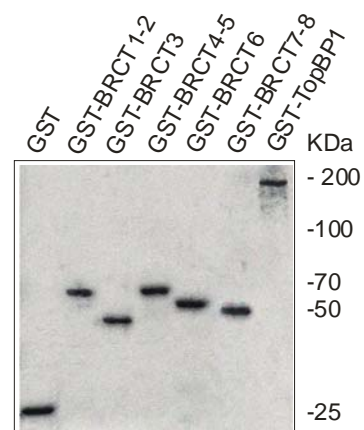
Dafür erfolgte zunächst neben der Aufreinigung des Gesamtlängen-Proteins (aa1-1435) die Aufreinigung folgender TopBP1-Fragmente BRCT1-2 (aa1-246), BRCT3 (aa247-401), BRCT4-5 (aa447-693), BRCT6 (aa706-916), und BRCT7-8 (aa1167-1323) als GST-Konstrukte (Abb.15A und B). Jedes dieser Konstrukte wurde mit [³⁵S]Methionin-gelabeltem Cdc45 inkubiert und im Anschluss über 10%ige SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. In Abb.15C ist zu sehen, dass Cdc45 nicht an die dritte, vierte, fünfte, siebente und achte BRCT-Domäne von TopBP1 binden konnte (Abb.15C, Bahnen 4, 5 und 7). Ebenso erfolgte keine Cdc45-Bindung an die Kontrolle GST (Abb.15C, Bahn2).

Die erste und zweite BRCT-Domäne (Abb.15C, Bahn 3) hingegen interagiert ebenso wie die sechste BRCT-Domäne (Abb.15C, Bahn 6) eindeutig mit Cdc45. Die Quantifizierungen der Interaktionen sind in Abb.15D dargestellt.

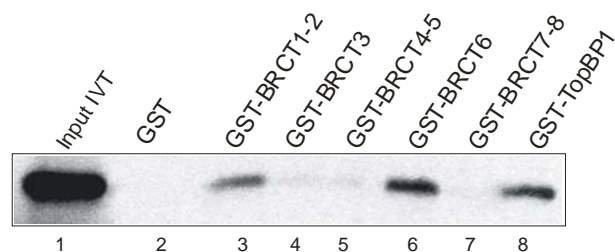
A.



B.



C.



D.

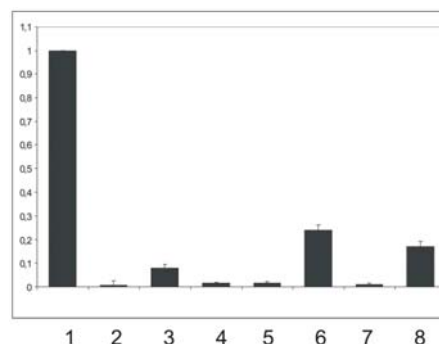


Abb.15: Cdc45 interagiert mit der ersten und zweiten, ebenso wie mit der sechsten BRCT-Domäne *in vitro*

- A:** Schematische Darstellung der an GST fusionierten TopBP1-Teilfragmente. Die Nummern der BRCT-Domänen sind angegeben; NLS: *Nuclear localization signal*
- B:** Coomassie-Färbung von GST und den GST-TopBP1-Teilkonstrukten
- C:** Ergebnisse der GST-Pull-down-Experimente, bei denen die TopBP1-Teilkonstrukte mit [³⁵S]Methionin-gelabeltem Cdc45 inkubiert wurden. Input: 10 µl des *in vitro* Translatat (eingesetzte Menge in allen *Pull-down*-assays)
- D:** Quantifizierung der GST-Pull-down-Experimente; die Intensität des Inputs wurde gleich 1 gesetzt; die Werte wurden in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt

Da für die *in vitro* Transkription/Translation Kaninchen-Retikulozyten genutzt wurde, kann eine Beteiligung der enthaltenen Bestandteile bei der Interaktion grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Dennoch weisen die Resultate auf eine direkte Interaktion von Cdc45 mit der 1. und 2. und mit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 *in vitro* hin.

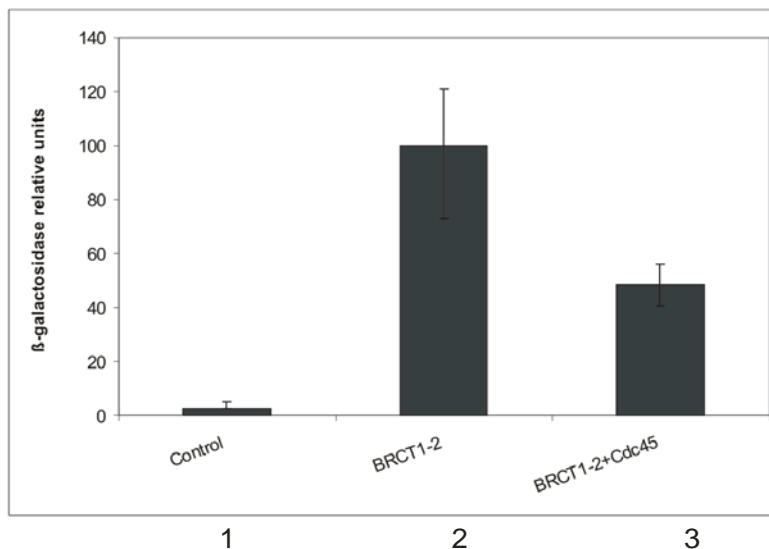
3.2.4 Cdc45 hemmt die Transkriptionsaktivität von TopBP1 in Hefe- und Säugerzellen

Verschiedene Autoren beschrieben die Möglichkeit, dass humanes TopBP1 als transkriptioneller Regulator fungieren kann. Weiterhin wurde gefunden, dass die BRCT-Domänen 1 und 2 diese regulatorische Funktion bedingen. Nach den *in vitro* Interaktionsdaten, die ergaben, dass Cdc45 an BRCT1-2 des Proteins TopBP1 bindet, sollte nun *in vivo* geprüft werden, inwieweit diese Interaktion die Transaktivierungsaktivität der 1.-2. BRCT-Domäne beeinflusst. Das TopBP1-BRCT1-2 (aa1-246)-Fragment wurde an DNA, die den C-Terminus der GAL4-Bindedomäne des pGBKT7-Vektors kodiert, ligiert. Dieses Konstrukt wurde in den *S. cerevisiae*-Stamm Y190 transformiert.

In nachfolgenden β -Galaktosidase-Assays konnte die Transaktivierungsaktivität des Konstruktes veranschaulicht werden (Abb.16A, Bahn 2). Diese Aktivität wurde 100% gleichgesetzt. Die Cotransformation von Y190 mit dem BRCT1-2-GAL4-DNA-Bindedomänen-Konstrukt und dem Cdc45-Expressionsvektor bewirkte das Absinken der transkriptionellen Aktivität um ca. 50% (Abb.16A, Bahn 3). Dieses Absinken belegte, dass Cdc45 die Transaktivierungsaktivität von TopBP1 in Bäckerhefe hemmte.

A.

Hefezellen



B.

HeLa-Zellen

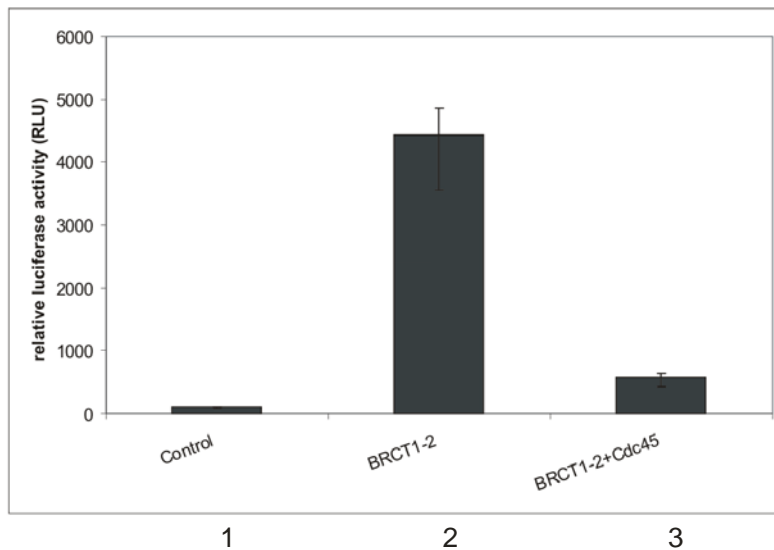


Abb.16: Cdc45 hemmt die transkriptionelle Aktivität von TopBP1 in Hefe- und Säugerzellen

A: Das TopBP1-BRCT1-2-Fragment wurde an DNA, die den C-Terminus der GAL4-Bindedomäne des pGBKT7-Vektors kodiert, ligiert. Cdc45 wurde in den Hefe-expressionsvektor pTEF423 kloniert. Der Hefestamm Y190, der die Reportergene HIS3 und lacZ unter der Kontrolle des GAL4-Promotor enthält, wurde transformiert:

1: mit dem pGBKT7-Vektor allein als Kontrolle; 2: mit TopBP1-BRCT1-2 allein

3: mit beiden Plasmiden.

β -Galaktosidase-Flüssigkulturassays bedurften O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) als Substrat. Die relativen Werte von 2 wurden gleich 100% gesetzt.

Die Diagramme stellen den jeweiligen Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen dar.

B: Ein die 1.-2. BRCT-Domäne von TopBP1 beinhaltendes PCR-Fragment (aa1-246) wurde in den pCMV-Vektor kloniert (pUS6). HeLa-Zellen (1×10^6) wurden mit folgenden Plasmiden cotransfiziert: 1) pCMV-BD, pFR-Luc-Luziferase Reportervektor und pHRLTK Renilla-Kontrollvektor als Negativkontrolle; 2) pUS6, pFR-luc und pHRLTK Renilla als "mammalian-one-hybrid"-System und 3) pUS6, pcDNA3-Cdc45L, pFR-luc und pHRLTK Renilla.

Die Firefly-Luziferase-Aktivität des Reporter-Konstruktes wurde mittels der Renilla-Luziferase-Aktivität normiert. Die „Relativen Luziferase Units (RLU)“ der Negativ-Kontrolle wurden 100% gleichgesetzt.

Ob Cdc45 die Transaktivierungsaktivität von TopBP1 auch in Säugerzellen hemmt, sollte durch die Expression von Cdc45 und TopBP1-BRCT1-2 in humanen Zellen festgestellt werden. Dazu wurde ein TopBP1-BRCT1-2 (aa1-246)-Fragment in den pCMV-BD-Vektor, der den C-Terminus der GAL4-Bindedomäne kodiert, kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pUS6 bezeichnet. HeLa-Zellen wurden mit den folgenden Plasmid-Kombinationen cotransfiziert:

1) pCMV-BD, pFR-Luc-Luziferase Reporter-Vektor und pHRLTK Renilla-Kontrollvektor als Negativkontrolle; 2) pUS6, pFR-luc und pHRLTK Renilla als “mammalian one hybrid“-System und 3) pUS6, pcDNA3-Cdc45L, pFR-luc und pHRLTK Renilla, um den Einfluss der Cdc45-Interaktion auf die Transaktivierung von TopBP1-BRCT1-2 zu prüfen.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und mit *Passive Lysis Buffer* (Promega) lysiert. Mittels des Dual-Luziferase-Assay-System (Promega) konnten die Luziferase-Aktivitäten der Zellextrakte bestimmt werden. Zunächst wurde eine signifikante Transaktivierung des Luziferase-Reporter-Konstruktes durch pUS6 festgestellt. Die hier ermittelten relativen Luziferase-Einheiten (RLU) wurden 100% gleichgesetzt (Abb.16B, Bahn 2). Die Cotransfektion der HeLa-Zellen mit pUS6 und pcDNA3-Cdc45L resultierte in einer drastischen Verringerung der Transaktivierungsaktivität um 90% (Abb.16B, Bahn 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass Cdc45 in der Lage ist, die transkriptionelle Aktivität von TopBP1 nicht nur in Bäckerhefe, sondern auch in Säugerzellen zu senken. Auch diese Tatsache spricht für eine *in vivo* Interaktion von TopBP1 und Cdc45.

3.2.5 Die Überexpression der 6.BRCT-Domäne in HeLa-Zellen führt zur verminderten Bindung von Cdc45 an das Chromatin

In einigen Arbeiten wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, dass der N-terminale Teil des *Xenopus* Cut5-Proteins (TopBP1-Homolog), welcher die BRCT-Domänen 1-5 enthält, ausreicht, um einen Defekt in der Replikation, der dem Entzug von Cut5 aus einem *Xenopus*-Replikationssystem folgt, aufzuheben (Yan *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2006). Dies wirft die Frage auf, ob in humanen Zellen die oben beschriebene Interaktion zwischen Cdc45 und der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 eine Rolle in der Replikation spielen kann.

Um diese Frage zu beantworten, wurden DNA-Fragmente, die für die His-getaggten BRCT-Domänen 6 bzw. 4 und 5 kodieren, in den pCEP4-Expressionsvektor (Invitrogen) kloniert. Der Vektor enthält ein Hygromycin-Resistenzgen, welches nach erfolgter Transfektion der Konstrukte, eine Selektion von stabilen Zelllinien mittels Hygromycin B erlaubt. HeLa-Zellen wurden mit den oben genannten Konstrukten transfiziert, 6-8 Tage nach Hygromycin B-Selektion geerntet und fraktioniert. Die so erhaltenen cytoplasmatischen (S2), nukleoplasmatischen (S3) und chromatinhaltigen (P3) Fraktionen wurden über Western blot-Analysen untersucht. Die *upstream activator*-Kinase Mek2, die im Cytoplasma über den gesamten Zellzyklus hinweg zu finden ist, Lamin B1, das in der Kernmembran verankert ist und Histon H1, welches an Chromatin gebunden in allen Zellzyklusphasen vorkommt, wurden als Marker für ein gleichmäßiges Auftragen der Proteinfractionen eingesetzt.

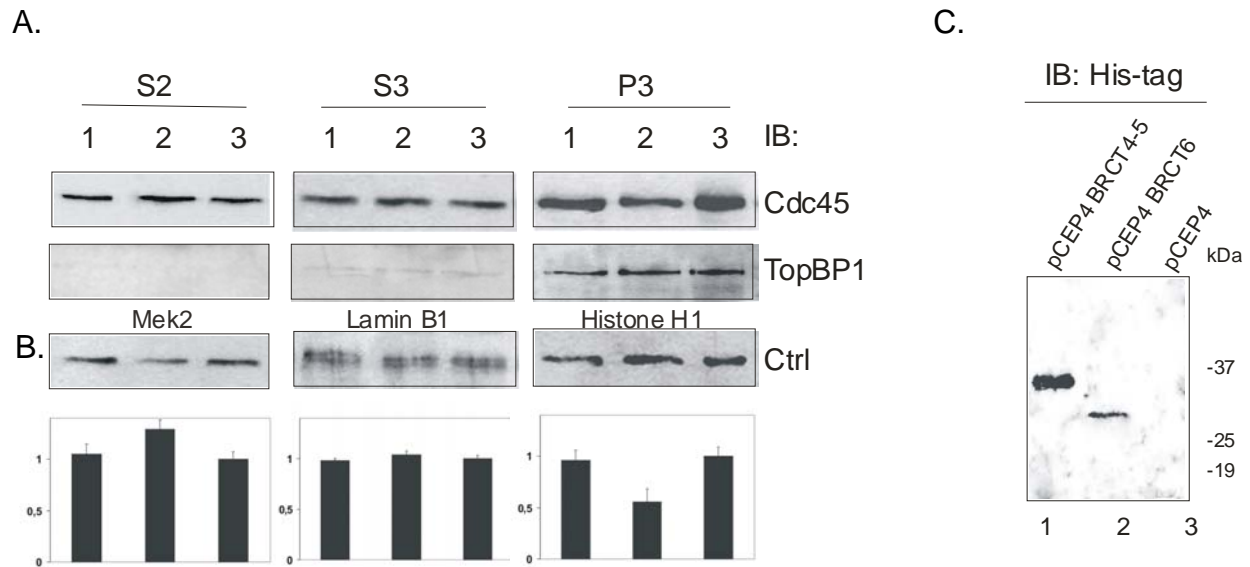


Abb.17: Überexpression der 6.BRCT-Domäne in HeLa-Zellen führt zu einer Verminderung der Cdc45-Bindung an das Chromatin

HeLa-Zellen wurden transfiziert mit 1) pCEP4-TopBP1-BRCT4-5; 2) pCEP4-TopBP1-BRCT6 und 3) pCEP4, dem puren Vektor als Kontrolle

6-8 Tage nach Hygromycin-Selektion wurden die Zellen geerntet und fraktioniert in cytoplasmatische (S2), nukleoplasmatische (S3) und chromatinhaltige Fraktion (P3)

A: Die Fraktionen wurden über Western blot-Experimente unter Nutzung der Antikörper Cdc45, TopBP1, Mek2, Lamin B1 und Histone H1 analysiert

B: Quantifizierung der Cdc45-Blots aller drei Fraktionen

Die Intensitäten der Cdc45-Banden wurden genauestens mit der Intensität der jeweiligen Ladekontrolle (Ctrl) abgeglichen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten

C: Expression der His-getaggten 1) 4. und 5. bzw. 2) 6. BRCT-Domäne, detektiert mittels anti-His-tag-Antikörper

Nach erfolgter Überexpression der 6. BRCT-Domäne konnte eine deutliche Verminderung der Bindung von Cdc45 an das Chromatin festgestellt werden. Abb.17A und B ist zu entnehmen, dass im Vergleich zur Kontrolle ca. 44% weniger Cdc45 am Chromatin zu detektieren war. Im Gegensatz dazu konnte in der zytoplasmatischen Fraktion ein Anstieg der Cdc45-Konzentration von 29% registriert werden. Die Bindung von TopBP1 an das Chromatin blieb unverändert. Zellen in denen die 4.-5. BRCT-Domäne überexprimiert waren zeigten, ebenso wie die Kontrolle (Transfektion des pCEP4-Vektors allein), keinen Unterschied hinsichtlich der Bindung von Cdc45 oder TopBP1 an das Chromatin. Die Expression der His-getaggten BRCT-Domänen 6, 4 und 5 ist in Abb.17C dargestellt. Zusätzlich zur verminderten Bindung von Cdc45 ans Chromatin, zeigten die mit BRCT6-überexprimierten Zellen ein stark verlangsamtes Wachstum (Abb.18).

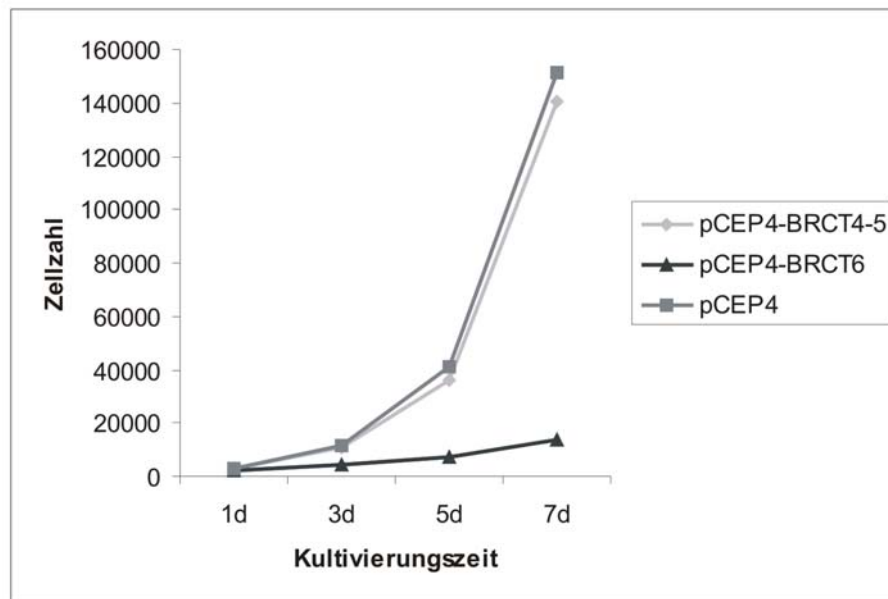


Abb.18: Wachstumskurven von HeLa-Zellen, in denen pCEP4-BRCT6, pCEP4-BRCT4-5 oder pCEP4 (Kontrolle) überexprimiert wurden

Die Daten stellen das jeweilige Mittel aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Anhand der Wachstumskurven für die Zellen, in denen die BRCT-Domänen 4.-5. bzw. die 6. BRCT-Domäne oder der pCEP4-Vektor allein (Kontrolle) überexprimiert wurden, kann man das rapide Absinken der Verdopplungszeit der Zellen, in denen die Überexpression von BRCT-Domäne 6 erfolgte, beobachten. Die BRCT6-überexprimierten Zellen zeigten kaum noch Teilungsaktivitäten, sodass nach 7 Tagen Kultivierung nur etwa ein Elftel (1/11) der Zellen, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen bzw. zu den Zellen mit den überexprimierten BRCT-Domänen 4-5, zu ernten waren. Die mit den BRCT-Domänen 4-5 überexprimierten HeLa-Zellen zeigten im Gegensatz dazu kaum eine Wachstumsveränderung im Vergleich zur Kontrolle (pCEP4).

Die unter 3.2 beschriebenen Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die direkte Interaktion von humanem TopBP1 und Cdc45 konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Unter Nutzung von TopBP1-Teilkonstrukten wurden die 1. und 2. BRCT-Domänen, sowie die 6. BRCT-Domäne für die funktionelle Interaktion mit Cdc45 eingegrenzt. Die Interaktion der 1. und 2. BRCT-Domänen mit Cdc45 bewirkte das Absinken ihrer transkriptionellen Aktivität in Hefe- und Säuger-Ein-Hybrid-Systemen. Beide Proteine interagierten ausschließlich in der frühen S-Phase des Zellzyklus. In der M-Phase konnte allenfalls eine sehr schwache Interaktion verzeichnet werden. Die Überexpression der 6. BRCT-Domäne führte zu einer verminderten Bindung von Cdc45 ans Chromatin.

3.3 Eine Mutationen innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 führt zum Absinken der Transaktivierungsaktivität

BRCT-Domänen-Proteine sind in vielfältige zelluläre Vorgänge involviert. Das Gen *BRCA1* (*breast cancer gene 1*) bzw. Mutationen dieses Gens sind maßgeblich an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt. Daneben steht es in engem Zusammenhang mit der Bildung von Ovarialkarzinomen, Kolonkarzinomen und Prostatakarzinom. Es kodiert für das Protein BRCA1, welches den Zellzyklus kontrolliert und löst im Falle irreparabler DNA-Schäden Apoptose aus. Neben *BRCA1*, sind auch die Gene *BRCA2* und *BRCA3*, die die Proteine BRCA2 und BRCA3 codieren, in die Krebsentstehung einbezogen.

Innerhalb der erwähnten finnischen Familienstudie, bei denen Familienmitglieder an Brustkrebs bzw. Ovarialkrebs erkrankt waren, wurden Keimbahnmutationen von *TopBP1* näher untersucht (Karppinen *et al.*, 2006). Besonders auffällig zeigte sich dabei eine heterozygote Mutation, die die Aminosäure 309 des Proteins TopBP1 betraf (Karppinen *et al.*, 2006). Mittels Mutagenesestudien sollte beruhend auf diesen *TopBP1*-Studien die Mutation (und deren Auswirkung) des oben genannten Nukleotids im *TopBP1*-Gen näher beleuchtet werden. Die Aminosäure 309 des Gesamtproteins befindet sich innerhalb der BRCT1-2- und damit in der Transaktivierungsdomäne. Durch Substitution eines Nukleotids an der Position 1010 des Gesamtgens wurde das Triplet CGT in TGT umgeschrieben. Dies hatte zur Folge, dass nun statt eines Arginins ein Cystein in die Aminosäurekette des Proteins eingebaut wurde.

Mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene konnte an der Position 1010 innerhalb des BRCT-1-2-Domänen-Fragmentes die Substitution des Cytosins zu einem Thymin erfolgen. Für die anschließende Analyse der Transaktivierungsaktivität in Hefezellen wurde das pGBKT7-BRCT1-2-Konstrukt (beschrieben unter 3.2.4) als Matrize genutzt. Das resultierende Plasmid wurde als pGBKT7-BRCT1-2mut bezeichnet. Die Grundlage für die Säugerzell-Versuche war das pCMV-BRCT1-2-Konstrukt (siehe 3.2.4). Hieraus entstand das Plasmid pCMV-BRCT1-2mut. Hefezellen wurden entweder mit pGBKT7-BRCT1-2 oder mit pGBKT7-BRCT1-2mut transformiert. Über β -Galaktosidase-Flüssigkulturassays erfolgte in beiden Fällen die Bestimmung der Transaktivierungsaktivitäten.

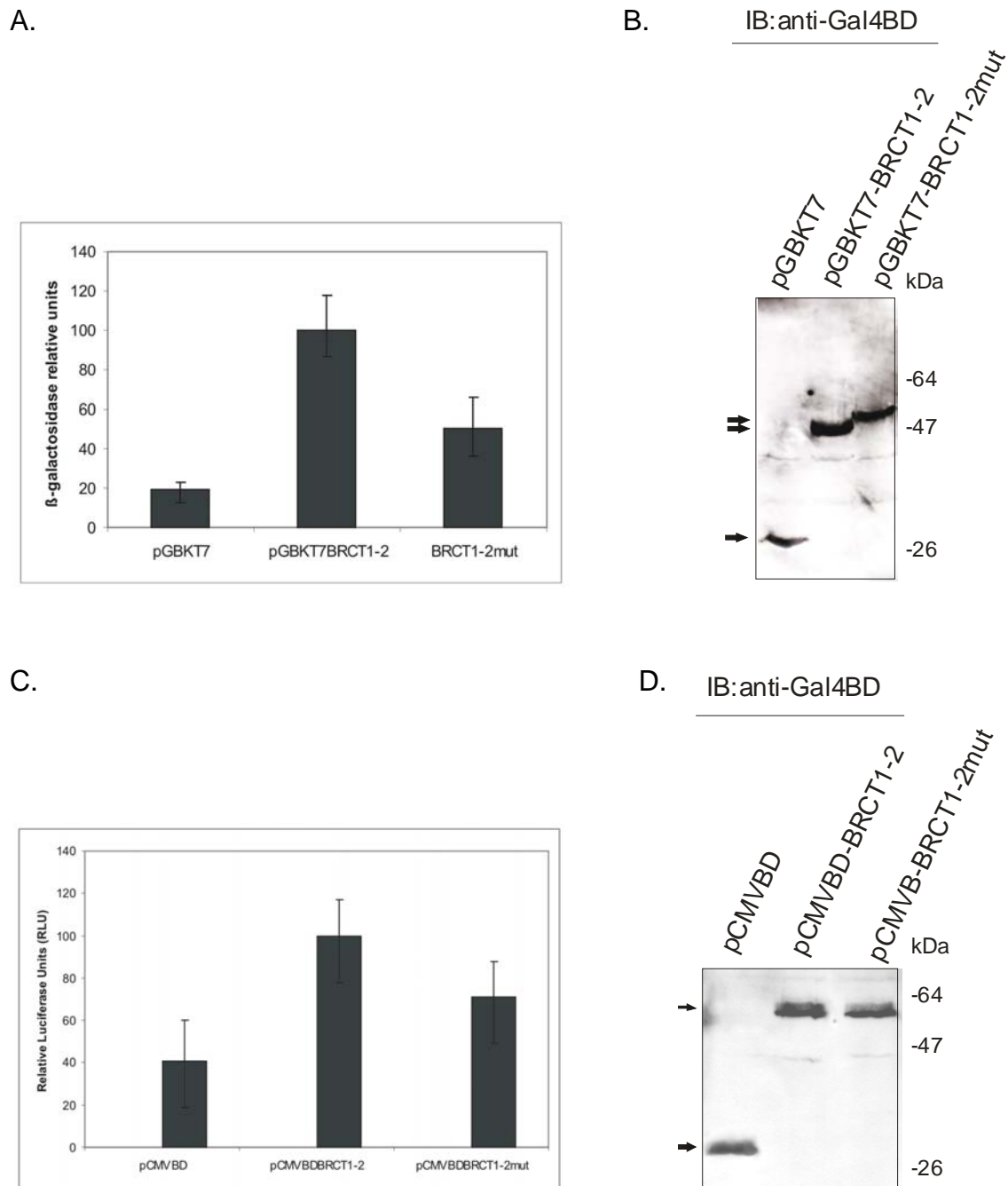


Abb.19: Eine Mutation (Arg308Cys) innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 führt zum Absinken der transkriptionellen Aktivität

A: Mutagenesestudien in Hefezellen; Quantifizierung der β -Galaktosidase-Flüssigkultur-Assays; dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerabweichungen aus 5 unabhängigen Versuchen

B: Immunoblot der Hefeextrakte unter Verwendung von anti-Gal4-Antikörpern

C: Mutagenesestudien in HeLa-Zellen; Quantifizierung der Luziferase-Assays; dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerabweichungen aus 5 unabhängigen Versuchen

D: Immunoblot der HeLa-Lysate; die Detektion erfolgte mittels anti-Gal4BD-Antikörpern

Nach der HeLa-Zell-Transfektion mit folgenden Plasmid-Kombinationen: 1. pCMV-BD, pFR-Luc-Luziferase Reporter-Vektor und pHRLTK Renilla-Kontrollvektor (als Negativkontrolle), 2. pCMV-BRCT1-2, pFR-luc und pHRLTK Renilla (als *mammalian-one-hybrid*-System) und 3. pCMV-BRCT1-2mut, pFR-luc und pHRLTK Renilla (um den Einfluss der Cdc45-Interaktion auf die Transaktivierung von TopBP1-BRCT1-2 zu prüfen) wurden die Zellen 48 h kultiviert, geerntet und nach Angaben der Firma Promega für die Luziferase-Bestimmung aufbereitet. Mittels des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems erfolgte im Anschluss die Bestimmung der Luziferase-Aktivitäten in den Zellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen in Hefe- und in HeLa-Zellen sind in den Abb.19A und B dargestellt.

Die transkriptionelle Aktivität der 1. und 2. BRCT-Domäne von TopBP1 wurde in dieser Arbeit bereits im Zusammenhang mit der Beeinflussung der Transaktivierungsaktivität durch Cdc45 unter 3.2.4 gezeigt. Insofern wurden die in Hefe- und HeLa-Zellen wiederholt ermittelten β -Galaktosidase- bzw. Luziferasesaktivitäten der BRCT-Domänen-1-2-Konstrukte gleich 100% gesetzt (Abb.19A und C). Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivitäten für die BRCT1-2-Mutationskonstrukte (BRCT1-2mut). Die Quantifizierungen 5 voneinander unabhängiger β -Galaktosidase-Assays sind der Abb.19A, die der 5 Luziferase-Assays der Abb.19C zu entnehmen.

Sehr deutlich war die starke Abnahme der Transaktivierungsaktivitäten der mutagenisierten Konstrukte sowohl in Hefezellen als auch in Säugerzellen zu beobachten. So sank in Hefezellen die transkriptionelle Aktivität der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 aufgrund der Mutation Arg309Cys um ca. 45%, in HeLa-Zellen um ca. 25%. Diese Daten verwiesen auf den sehr deutlichen Einfluss der Punktmutation des Basenpaares 1010 auf die Transaktivierungsaktivität der ersten beiden BRCT-Domänen des Proteins TopBP1.

4. Diskussion

Diese Arbeit betrachtet TopBP1 unter dem Aspekt eines multifunktionellen Signalproteins. Prozesse wie DNA-Reparatur, Replikation, Transkription und Krebsentstehung werden oft getrennt voneinander betrachtet und dargestellt. TopBP1 aber scheint diese Prozesse durch seine Wechselwirkung mit sehr verschiedenen Proteinen, darunter Enzyme und Transkriptionsfaktoren, miteinander verbinden zu können. Einige dieser interagierenden Proteine sind bereits bekannt, viele mit Sicherheit noch unbekannt. Unter den nunmehr bekannten Interaktionspartnern befinden sich PARP-1 und Cdc45, zwei Faktoren, die in unterschiedliche zelluläre Vorgänge, in die DNA-Reparatur und DNA-Replikation, involviert sind. Die in dieser Arbeit aufgeklärten funktionellen Aspekte der Interaktionen können Rückschlüsse auf weitere Interaktionen und deren Auswirkungen geben. Auch die Betrachtung der transkriptionellen Aktivität des Proteins TopBP1 und der Auswirkungen von Mutationen innerhalb der Transaktivierungsdomäne zeigen einmal mehr, wie vielfältig dieses Protein wirken kann und wie unerschlossen seine Funktionen noch immer sind. So scheinen weiterführende Studien unabdingbar.

4.1 TopBP1 interagiert mit PARP-1

Die Studien dieser Arbeit zeigen erstens, dass PARP-1 mit der 6. BRCT-Domäne des Proteins TopBP1 *in vitro* interagiert (siehe 3.1.2). Zweitens konnte PARP-1 mit einem TopBP1-Antikörper *in vivo* in HeLa-S3-Zellen copräzipitiert werden und beide Proteine waren in überlappenden Regionen der Zellkerne von HeLa-S3-Zellen lokalisiert (siehe 3.1.3 und 3.1.4). Drittens wurde TopBP1 durch PARP-1 poly(ADP-ribosyl)iert (siehe 3.1.5) und viertens hemmt diese ADP-Ribosylierung von TopBP1 seine Bindung zu Miz-1 (siehe 3.1.6).

Dass TopBP1 mit verschiedenen Proteinen, die in unterschiedliche zelluläre Prozesse involviert sind, interagiert, wurde in früheren Arbeiten gezeigt (Boner *et al.*, 2002; Mäkinen *et al.*, 2001; Herold *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Honda *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Eines dieser Proteine ist Miz1. Miz1 vermittelt die Unterdrückung der Transkription über das Onkogen-Produkt c-Myc. Es ist über Myc insbesondere in die negative Regulation der UV-Antwort in Säugetieren einbezogen (Herold *et al.*, 2002). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Miz1 nach UV-Behandlung von humanen Keratinozyten aus TopBP1-Miz1-Proteinkomplex entlassen wird, was Miz1 erlaubt, am Zellzyklusarrest als Antwort auf DNA-Schädigungen

mitzuwirken (Herold *et al.*, 2002). Trotzdem ist wenig bekannt über den Mechanismus der Auflösung des TopBP1-Miz-1-Proteinkomplexes nach UV-Strahlung.

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die posttranslationale Oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1 durch PARP-1 das Entlassen von Miz1 aus dem oben genannten Komplex verursacht. Poly(ADP-ribose) (PAR) wird dem Anschein nach in allen eukaryotischen Organismen von einer Familie von Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP) gebildet (Ame *et al.*, 2004). PARP-1 war einige Zeit lang das einzige bekannte Mitglied der PARP-Familie. Es ist ein DNA-Schadenssignalprotein, welches seine Automodifikation mit unterschiedlich langen ADP-Ribose-Polymeren bewirkt. Über diese Polymere bindet PARP-1 nicht-kovalent an andere Proteine, wie p53 (Malanga *et al.*, 1998), p21 (Pleschke *et al.*, 2000) oder die DNA-abhängige Proteinkinase (Ruscetti *et al.*, 1998) und ändert ihre Eigenschaften, beispielsweise die DNA-Bindung (Pleschke *et al.*, 2000).

Die Coimmunopräzipitation von TopBP1 und PARP-1 in unbehandelten HeLa-S3-Zellen zeigte, dass die Interaktion zwischen beiden Proteinen die Oligo(ADP-ribosyl)ierung nicht erforderte (siehe Abb.7). Es gibt weitere Beispiele für Proteine, die mit nicht-modifizierten Mitgliedern der PARP-Familie interagieren, z.B. XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing 1*) (Masson *et al.*, 1998) oder Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) (Bae *et al.*, 2003).

Dennoch wurde eine leichte Verstärkung der *in vivo* Interaktion von TopBP1 und PARP-1 verzeichnet, nachdem die HeLa-S3-Zellen UVB-Strahlung ausgesetzt waren, einem Einfluss, der zur PAR-Synthese geführt hatte (siehe Abb.7). Die geringfügig verstärkte Interaktion könnte durch die nicht-kovalente Interaktion PARP-1-ADP-Ribose-Polymeren mit dem PAR-Bindemotiv innerhalb der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 hervorgerufen werden.

Nach DNA-Schäden, die beispielsweise durch UV-Strahlung entstehen, bindet PARP-1 zunächst an die hervorgerufenen DNA-Strangbrüche, gefolgt von einer raschen Aktivierung des Enzyms. PARP-1 wird auto-poly(ADP-ribosyl)iert mit bis zu 200 PAR-Resten, was die Komplexbildung mit verschiedenen Akzeptor-Proteinen erlaubt. Es scheint, als ob die Bindung an die Oligo(ADP-ribosyl)-Ketten von PARP-1 diese Proteine, die insbesondere in DNA-Reparatur, Replikation und Transkription involviert sind, in die Umgebung der DNA-Strangbrüche bringt und so die Mitwirkung am Reparaturprozess ermöglicht (Hong *et al.*, 2004).

Ein ähnliches Szenario könnte auch für TopBP1 angenommen werden. TopBP1 wurde, wie beschrieben, durch PARP-1 in Anwesenheit genickter DNA *in vitro* oligo(ADP-ribosyl)iert und beide Proteine waren in überlappenden Regionen der HeLa-S3-Zellkerne zu finden

(Abb.8 und 9). Darum ist anzunehmen, dass DNA-Schädigungen neben der PARP-1-Auto-Poly(ADP-ribosyl)ierung, eine Oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1 herbeiführen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die 6. BRCT-Domäne von TopBP1 ausreichend für die PARP-1-Bindung und für seine Oligo(ADP-ribosyl)ation ist (Abb.10).

Das Protein Miz1 bindet an die 7. BRCT-Domäne von TopBP1 (Herold *et al.*, 2002), die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der oben erwähnten 6. BRCT-Domäne befindet. Miz1 wird als Antwort auf DNA-Schädigungen aus dem Komplex mit TopBP1 entlassen (Herold *et al.*, 2002). Es wäre vorstellbar, dass die Oligo(ADP-ribosyl)-Ketten auf der Oberfläche der 6. BRCT-Domäne und die Bindung von oligo(ADP-ribosyl)iertem PARP-1 ein sterisches Hindernis für die Miz1-Bindung an die benachbarte 7. BRCT-Domäne darstellen. Und dies könnte zu einer Zerstörung des Miz1-TopBP1-Komplexes, als Antwort der DNA-Schädigungen, führen.

In der Tat konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass die Oligo(ADP-ribosyl)ierung von TopBP1 die Bindung an Miz1 beeinträchtigt (Abb.11B). PARP-1 und TopBP1 kooperieren unter Umständen bei der Regulation der Funktion beider Proteine während der DNA-Reparatur, Replikation und anderen wichtigen zellulären Prozessen.

Die Bildung eines Komplexes aus TopBP1, PARP-1 and Miz1 (und gegebenenfalls weiteren Proteinen) und die Zerstörung dieses Komplexes unter verschiedenen Bedingungen, wie DNA-Schädigungen, wirft die Frage auf, ob TopBP1 als ein sogenanntes *scaffold* (Rückgrad)-Protein agiert, das Proteine unter variierenden physiologischen Bedingungen bindet bzw. aus ihrer Bindung entlässt.

TopBP1-*knock-down*-Zellen könnten zur Aufklärung der Frage beitragen, ob der Apoptoseprozess, der nach Hemmung der TopBP1-Expression durch Antisense-Morpholino-oligomere (Yamane *et al.*, 2002) eintritt, durch einen der freigesetzten TopBP1-Interaktionspartner, wie beispielsweise PARP-1, bedingt ist.

4.2 Charakterisierung der Interaktion von humanem TopBP1 und Cdc45

TopBP1, das Vertebraten-Homologe zum Hefezell-Protein Cut5/Dbp11, unterscheidet sich durch seine Doppelrolle bei der DNA-Schadensantwort und der Initiation der DNA-Replikation von anderen BRCT-Domänen-Proteinen. Die Rolle von TopBP1 und seinen Homologen in der *checkpoint*-Regulation ist weitestgehend bekannt. Relativ neu hingegen ist, dass die Aktivität der Proteinkinase ATR, einem *upstream*-Regulator der Kontrollpunktantworten, durch Xtopbp1/Xmus101 stark erhöht wird.

Zudem wurde gefunden, dass Xtopbp1-Mutanten hinsichtlich der Kontrollpunktregulation gestört waren (Kumagai *et al.*, 2007).

Wenngleich die Teilnahme von humanem TopBP1 in der DNA-Schadensregulation unumstritten ist, gibt es widersprüchliche Resultate, die Rolle von TopBP1 in der Replikation betreffend. Dies ist nicht überraschend, da ein Großteil der Erkenntnisse über die Replikation aus Hefe- und *Xenopus*-Systemen stammt. Die eukaryotische DNA-Replikation findet in 3 Stufen statt, 1. der Aufbau des Prä-Replikationskomplexes (pre-RC), 2. die Initiation und 3. die Elongation (Blow & Dutta, 2005; Machida, Hamlin, Dutta, 2005). Der Prä-Replikationskomplex wird während der G1-Phase gebildet und beinhaltet die ORC-, Cdc6-, und Cdt1-abhängige Rekrutierung des MCM₂₋₇-Komplex zu den Ursprüngen (origins) der Replikation. Am G1/S-Übergang befinden sich MCM10, Cdc45, Dbp11/Cut5, GINS (*go ichi ni san*) und Sld2 am Replikationsursprung (Gambus *et al.*, 2006) (Abb.20).

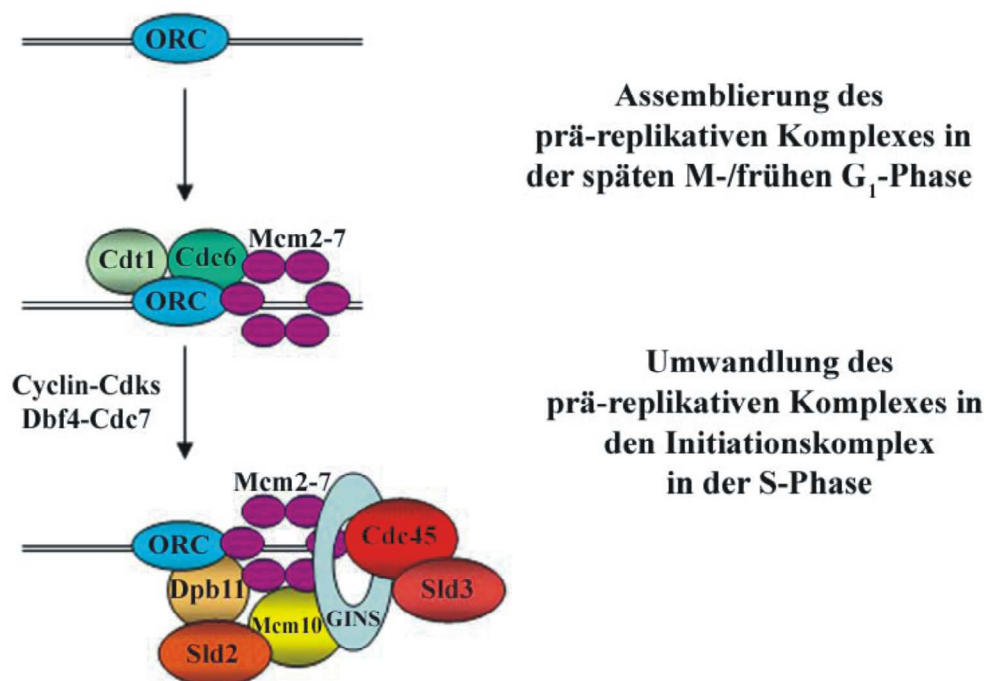


Abb.20: Initiation der DNA-Replikation an den Replikationsursprüngen (origins)

Das Modell zeigt die Bildung des prä-replikativen Komplexes aus Cdc6, Cdt1 und Mcm2-7 in der späten M-/frühen G₁-Phase. Die Umwandlung dieses Komplexes zum Initiationskomplex erfolgt in der S-Phase durch die Aktivität der Cdk2- und Cdc7-Kinasen und der Assemblierung der Replikationsfaktoren Dbp11, Sld2, Sld3, Mcm10, GINS und Cdc45. Das gezeigte hypothetische Modell entstammt vorrangig dem Wissen über die Replikationsvorgänge in Hefe.

Darstellung modifiziert nach Kearsley & Cotteril, 2003

Zusammen mit DDK- und CDK-Proteinkinasen aktivieren diese Faktoren die Chromatin-assoziierte replikative DNA-Helikase, v.a. wahrscheinlich den MCM₂₋₇ Komplex (Moyer, Lewis und Botchan, 2006; Yabuuchi *et al.*, 2006) (Abb.21). Die Helikase entwindet das Origin und die DNA-Polymerasen α , δ , und ϵ werden rekrutiert, um das intakte Replisom zu bilden. Während der Elongation werden die sogenannte Führungs (*leading*)- und Folge (*lagging*)-Stränge synthetisiert.

Welche Rolle aber spielt TopBP1 in diesem Prozess?

Experimente mit Spaltheefe und *Xenopus* zeigten, dass Rad4/Cut5 and Xmus101 benötigt werden, um das Replikationsprotein Cdc45 an das Chromatin zu bringen (Dolan *et al.*, 2004; Van Hatten *et al.*, 2002). Für die Spaltheefe belegten Zegerman und Diffley (Zegermann & Diffley, 2007) und Tanaka und Mitarbeiter (Tanaka *et al.*, 2007) unlängst, dass Dbp11 phosphoryliertes Sld2 und Sld3 verknüpft, um die Interaktionen zwischen Replikationsproteinen, wie Cdc45 and GINS, zu ermöglichen. Orthologe des Hefe-Sld2 und-Sld3 in Metazoen (Vielzellern) sind bislang nicht bekannt. Der N-Terminus des humanen RecQL4, einer Helikase, weist Homologien mit dem N-Terminus von Sld2 auf, was zur Annahme führt, dass RecQL4 ein Metazoen-Ortholog des Hefe-Sld2 ist. RecQL4 wird für die Cdc2-abhängige Cdc45-Bindung ans Chromatin nicht benötigt (Sangrithi *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde die direkte Interaktion zwischen humanem TopBP1 und Cdc45 *in vitro* und *in vivo* mittels Glutathione S-Transferase(GST)-*Pull-down* und Coimmunopräzipitation-Techniken belegt (siehe 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3). Zudem konnte eine erhebliche Hemmung der transkriptionellen Aktivität von TopBP1 in Bäckerhefe und Säugerzellen durch Cdc45 beobachtet werden (siehe 3.2.4).

Somit stellt Cdc45, nach dem heutigen Wissensstand, das erste Protein dar, welches in der Lage ist, die Transaktivierungsaktivität von TopBP1 zu hemmen. Diese Tatsache ist ein zusätzlicher Beleg für die *in vivo* Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45.

Beide Proteine interagierten ausschließlich am G1/S-Übergang und in der frühen S-Phase des Zellzyklus. Eine Interaktion in der M-Phase hingegen konnte nicht registriert werden (siehe Abb.12).

Davon ausgehend, dass die Interaktion zwischen TopBP1 und Cdc45 am Chromatin stattfindet (Garcia *et al.*, 2005), stehen die hier erstellten Daten in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen von Saha und Mitarbeitern. Sie belegten, dass die Affinität des Cdc45-Proteins zu einem Kernbestandteil signifikant vermindert ist, sowie die DNA-Replikation voranschreitet (Saha *et al.*, 1998).

In einer jüngst veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass humanes Cdc45 von der späten G1-bis zur G2-Phase im Zellkern lokalisiert ist, in der M-Phase aber überall in der Zelle und nicht länger mit DNA assoziiert vorkommt (Bauerschmidt *et al.*, 2007). Kim und Mitarbeiter wiesen humanes TopBP1 nur dann in der chromatinhaltigen Fraktion nach, wenn die Zellen die Mitose verließen und in die S-Phase eintraten (Kim *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der Arbeit von Kim und Mitarbeitern führten zu der Idee, dass humanes TopBP1 zwar als Cdc45-Ladefaktor fungiert, für die Fortführung der DNA-Replikation aber, nach Vollendung der Initiation, nicht mehr benötigt wird. Diese Annahme würde mit der Rolle der TopBP1-Homologen in Hefe und *Xenopus* konform gehen (Abb.21).

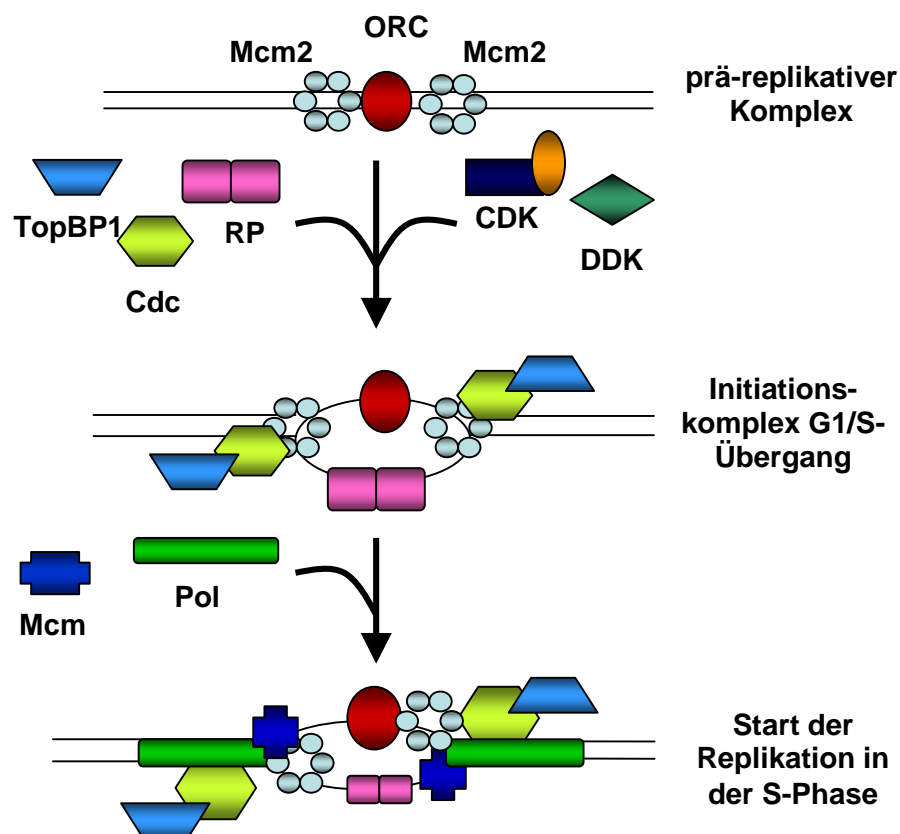


Abb.21: Modell für die Bildung des replikativen Komplexes (Pollok *et al.*, 2003)

Späte G1-Phase: Assemblierung des prä-replikativen Komplexes

Übergang G1-/S-Phase: Umwandlung des prä-replikativen Komplexes in den Initiationskomplex

S-Phase: Start der Replikation

Cdc45 hingegen wirkt sowohl bei der Initiation der Replikation, als auch bei der Elongation, möglicherweise als Helikase-Prozessionsfaktor Cdc45, mit (Pacek & Walter, 2004; Pacek *et al.*, 2006; Bauerschmidt *et al.*, 2007).

Bedeutet die dargestellte physiologische Interaktion von TopBP1 und Cdc45 aber tatsächlich das Mitwirken von TopBP1 innerhalb des Replikationsprozesses?

In dieser Arbeit wurde die Cdc45-Bindung an die 6. BRCT-Domäne von TopBP1 gezeigt (siehe Abb.15). Diese Region ist, in Bezug auf die DNA-Replikation, aus zwei Gründen äußerst interessant. Erstens wurde eine Hemmung der replikativen DNA-Synthese in HeLa-Zellkernen *in vitro* mittels eines Antiserums gegen die 6. BRCT-Domäne beobachtet. Daraus schlussfolgernd wurde vermutet, dass ein unbekanntes Protein, welches mit dieser Region von TopBP1 interagiert, in die Replikation eingebunden ist (Mäkinen *et al.*, 2001). Zweitens konnte die Interaktion des Transkriptionsfaktors E2F mit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 belegt werden (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004).

Die Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren-Familie binden an E2F-Promotorregionen und regulieren die Expression einer großen Anzahl von Genen, welche Proteine kodieren, die in DNA-Replikation und Zellzyklusablauf involviert sind (Ren *et al.*, 2002).

Dem entgegen stehen die Ergebnisse zweier Arbeiten, in denen auf eine strikte Trennung der Replikationsinitiationsfunktion von der *checkpoint*-Funktion in *Xenopus* Cut5/TopBP1 verwiesen wurde. Das N-terminale Fragment, das heißt die Region von Cut5, die durch die Evolution hindurch konserviert ist und die BRCT-Domänen 1-5 enthält, wäre verantwortlich für die Initiation und nicht in der Lage zu einer *checkpoint*-Aktivierung beizutragen. Dem C-terminalen Fragment hingegen, welches in den Metazoen-Spezies einheitlich auftritt, käme einzig die Aufgabe der Aktivierung des *checkpoint* zu (Yan *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2006).

Zur Unterstützung der Annahme, dass die nun gefundene Interaktion von humanem Cdc45 mit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 wichtig für die Chromosomenreplikation ist, wurde die 6. BRCT-Domäne in HeLa-Zellen überexprimiert. Es wurde eine Störung der Replikation in diesen Zellen erwartet. TopBP1 sollte ans Chromatin geladen werden, Cdc45 dagegen vermindert am Chromatin zu finden sein. In der Tat konnte aufgrund der Überexpression der 6. BRCT-Domäne von humanem TopBP1 eine reduzierte Bindung von Cdc45 ans Chromatin nachgewiesen werden (siehe Abb.17). Eine Beeinflussung der Bindung von TopBP1 war nicht zu verzeichnen. In Zellen, in denen die 4. und 5. BRCT-Domäne überexprimiert wurden (welche *in vitro* nicht mit Cdc45 interagierten), konnte keine Veränderung der Bindungen von

Cdc45 oder von TopBP1 ans Chromatin bemerkt werden, ähnlich den Kontrollzellen, die einzig mit dem pCEP4-Vektor transfiziert wurden (Abb.17).

Aus den Wachstumskurven geht die stark verminderte Zellteilung und die dadurch verminderte Zellzahl der BRCT6-überexprimierten Zellen hervor (Abb.18). Dies scheint auf eine gestörte Replikation zurückzuführen sein, sodass die Zellen nicht mehr teilungsfähig sind. Ob hierbei die Bildung des Initiationskomplexes beeinflusst wird, müssten weitere Tests aufklären.

Cdc45 ist nicht das einzige Protein, das mit der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 interagiert. Auch die Proteine PARP-1 (Wollmann & Schmidt *et al.*, 2007) und E2F1 (Liu *et al.*, 2004) zeigten eine Wechselwirkung mit genau dieser Domäne und die Möglichkeit für weitere Proteine, die mit der 6. BRCT-Domäne interagieren, ist durchaus gegeben. Das Entlassen und Binden der Proteine scheint von variierenden physiologischen Bedingungen abhängig und somit zeitlich reguliert zu sein. Aus diesen Gründen muss Cdc45 nicht allein für die unter 3.2.5 dargestellte Inhibition der Zellteilung der BRCT6-überexprimierten HeLa-Zellen verantwortlich sein.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass humanes TopBP1 eine wesentliche Rolle im Initialstadium der DNA-Replikation durch die Interaktion mit dem Replikationsfaktor Cdc45 und die Ladung dieses Proteins an das Chromatin, also an die Orte der DNA-Replikation, spielt.

Mit Hilfe eines humanen *in vitro* Replikationssystems könnte die Funktion von TopBP1 bzw. der einzelnen BRCT-Domänen in der Replikation noch wesentlich detaillierter aufgeklärt werden.

4.3 Eine Mutationen innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 führt zum Absinken der Transaktivierungsaktivität

Eukaryotische RNA-Polymerasen benötigen zum Erkennen des Transkriptionsstartpunktes von Genen generelle (basale) Transkriptionsfaktoren. Der minimale (basalen) Apparat für die Transkription von Protein-kodierenden Genen besteht aus RNA Polymerase II-Komplex und seine assoziierten generellen Transkriptionsfaktoren (TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-E, TFII-F und TFII-H). Durch die kompakte Organisation des Chromatins wird die basale Aktivität der RNA Polymerase II normalerweise unterdrückt.

Erst durch regulatorische Transkriptionsfaktoren und deren Cofaktoren wird die Transkription ermöglicht (Roeder, 2005; Sims *et al.*, 2004). Regulatorische Transkriptionsfaktoren binden

sequenzspezifisch an DNA-Elemente, die sich innerhalb der Promotoren ihrer Zielgene oder weit entfernt davon in sogenannten Enhancerelementen befinden können. Regulatorische Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut und beinhalten in der Regel eine DNA-Bindedomäne und eine Transaktivierungs- bzw. Transrepressionsdomäne. Ein Großteil der sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren beeinflusst die Initiation der Transkription durch Beeinflussung der Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes am Promotor.

Entweder interagieren sie direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat oder sie beeinflussen über Cofaktoren die Chromatinstruktur in der Umgebung ihrer Zielgene (Fischle *et al.*, 2003; Warren, 2002). Cofaktoren binden nicht direkt an DNA, sondern werden durch Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Eine Vielzahl von Cofaktoren besitzen Enzymaktivitäten, mit deren Hilfe sie Histone, DNA, den basalen Transkriptionsapparat oder andere Transkriptionsfaktoren modifizieren können.

In einer Studie von Karppinen und Kollegen (Karppinen *et al.*, 2006) wurden 125 finnische Familien, in denen Brust-und/oder Ovarialkrebsfälle auftraten nach Keimbahnmutationen des TopBP1-Gens untersucht.

Die C-terminalen Regionen von *TopBP1* und *BRCA1* weisen strukturelle Übereinstimmungen auf (Yamane *et al.*, 1997; Mäkinen *et al.*, 2001). Die Expression beider Proteine ist in der S-Phase am höchsten, beide werden als Antwort auf einen Replikationsblock bzw. DNA-Schädigungen von ATM phosphoryliert und colokalisieren mit den DNA-Schadstellen (Mäkinen *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2002; Cortez *et al.*, 1999). Hinzu kommen überlappende Funktionen bei der G2/M-checkpoint-Regulation, sie sind verantwortlich für Chk1-Phosphorylierung (Chk1 stellt eine ATR-Substrat dar) als Antwort auf DNA-Schädigungen (Reini *et al.*, 2004). TopBP1 assoziiert in intakten Zellen mit der Ubiquitin-Ligase hHR23A. Die Ubiquitinierung von TopBP1 führt zum Abbau des Proteins über den Proteasomen-Signalweg (Honda *et al.*, 2002). Eine strahlungsinduzierte Phosphorylierung von TopBP1 stabilisiert das Protein und stimuliert die Colokalisation mit BRCA1 und anderen Proteinen, die bei der DNA-Reparatur mitwirken, wie H2AX, PML, ATM (Yamane *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Mutationen im BRCA1-Gen stehen in engen Zusammenhang mit dem Entstehen von Brust- und/oder Ovarialkrebs (Ford *et al.*, 1994, 1998; Wernes *et al.*, 2000).

Die scheinbar enge Verbindung mit BRCA1 führte zu dieser Studie in der Annahme, dass auch Keimbahnveränderungen im TopBP1-Gen in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Krebs, insbesondere Brust- und/oder Ovarialkrebs stehen könnten.

19 verschiedene Sequenzveränderungen des TopBP1-Gens wurden innerhalb der Studie gefunden. 10 von ihnen lagen in Exon-Abschnitten des TopBP1-Gens und sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Table 1 – Sequence variation observed in the protein-encoding regions of the TopBP1 gene						
Exon	Nucleotide change	Effect on protein	Frequency ^a		P	Status
			Cases	Controls		
Ex8	1010C > T	Arg309Cys	15.2% (19/125)	7.0% (49/697)	0.002	Novel variant
Ex10	1454A > C	Lys457Gln	33.6% (42/125)	39.2% (116/296)	0.279	Known variant ^c
Ex12	1996T > C	Val637Val	20.8% (26/125)	21.1% (19/90)	0.956	Known variant ^c
Ex14	2535C > T	Ser817Leu	26.4% (33/125)	27.7% (155/559)	0.764	Known variant ^c
Ex18	3097G > A	Val1004Val ^b	3.2% (4/125)	3.5% (11/311)	1.000	Known variant ^c
Ex18	3123G > A	Arg1013Gln	12.0% (15/125)	10.9% (34/311)	0.750	Novel variant
Ex19	3210A > G	Asn1042Ser	36.0% (45/125)	38.2% (34/89)	0.742	Known variant ^c
Ex25	4163C > T	Leu1360Leu	35.2% (44/125)	34.1% (31/91)	0.863	Known variant ^c
Ex26	4336A > G	Ser1417Ser	0.8% (1/125)	– (0/362)	0.257	Novel variant
Ex27	4432A > G	Ser1449Ser	22.4% (28/125)	22.0% (20/91)	0.941	Known variant ^c

a Heterozygotes.
b Always observed together with Arg1013Gln.
c Reported in the SNP database.

Tabelle 7: Sequenzveränderungen innerhalb der Protein-codierenden Region von TopBP1 (Karppinen *et al.*, 2006)

Innerhalb der 19 gefundenen Veränderungen des TopBP1-Gens konnte eine Mutation mehr als andere mit dem Auftreten von Brust- und/oder Ovarialkrebs in Verbindung gebracht werden (Karppinen *et al.*, 2006). Sie zeigte sich in einem, im Vergleich zu den Kontrollzellen, signifikant höherem Anteil in den Ovarial- bzw. Brustkrebszellen. Der Abb.22 sind weitere gefundene Mutationen innerhalb des TopBP1-Gens zu entnehmen. Diese Mutationen kamen jedoch auch in hohem Maße in den Kontrollzellen vor. Somit konnte sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Brust-und/oder Ovarialkrebs und diesen Mutationen nicht herstellen lassen.

Die relevante Mutation betraf die Substitution des Cytosins zu einem Thymin an der Position 1010 des TopBP1-Gens (Abb.21). Durch die Substitution wird das Triplet CTG, das für die Aminosäure Arginin kodiert in das Triplet TGT umgewandelt, welches nunmehr für Cystein kodiert. Diese Mutation befindet sich innerhalb der ersten beiden BRCT-Domänen, die für ihre transkriptionelle Aktivität bekannt sind.

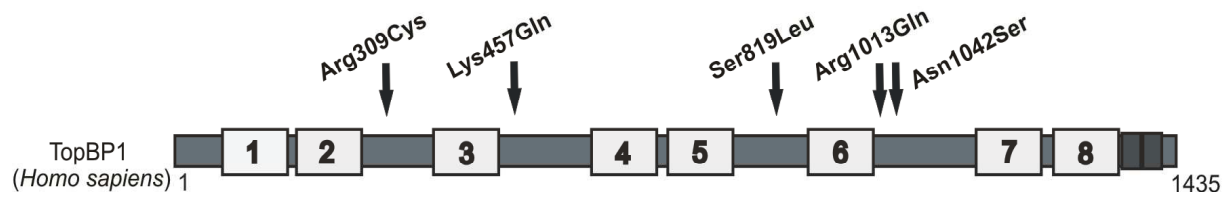


Abb.22: Lokalisation der *TopBP1*-Mutationen und der daraus folgenden Aminosäure-Austäusche (angelehnt an Karppinen *et al.*, 2006)

Mit Hilfe eines *Yeast-one-hybrid*- und eines *Mammalian-one-hybrid*-Systems (siehe 2.3.9.4 und 2.3.9.8) ließen sich die Transaktivierungsaktivitäten der Mutationskonstrukte im Vergleich zu den Ursprungskonstrukten darstellen. Die Analysen zeigten sowohl in Hefezellen als auch in humanen Zellen eine auffällige Abnahme der transkriptionellen Aktivität nach Einführung der Mutation in die BRCT1-2-Domänen-Konstrukte (siehe 3.3). Die transkriptionelle Aktivität sank nach Einführung der Mutation in Hefezellen um ~45%, in humanen Zellen um ~25% (Abb.19).

Der Austausch der Aminosäure Arginin, verursacht durch die Mutation im *TopBP1*-Gen, führte zum Teilverlust der transkriptionellen Aktivität der ersten beiden BRCT-Domänen des Proteins *TopBP1*. Arginin ist eine stark basische Aminosäure. Sie besitzt eine basische Guanidinogruppe, ist dadurch im Neutralbereich protoniert (positiv geladen) und gut wasserlöslich. Der isoelektrische Punkt liegt bei 11,76. Durch die Bindung von Protonen reagiert es alkalisch. Cystein hingegen zählt zu den neutralen Aminosäuren. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei 5,05. Von den Größenverhältnissen (Cystein ist im Gegensatz zu Arginin winzig) und den Bestandteilen (Arginin ist Stickstoff-, Cystein Schwefel-haltig) der beiden Aminosäuren einmal abgesehen, ist das Ladungsverhältnis der beiden Aminosäuren grundsätzlich verschieden. Dies könnte der Grund für ein vollkommen unterschiedliches Bindungsverhalten der BRCT-Domänen 1 und 2 in Bezug auf DNA und/oder Proteine sein und der Anlass dafür, dass die transkriptionelle Aktivität stark abnimmt. Auch die dreidimensionale Struktur eines Proteins spielt eine bedeutende Rolle für die Bindung an DNA und/oder Proteinen. Durch die geringfügig veränderte Struktur nach Einbau eines Cysteins (statt eines Arginins) in die Aminosäurekette wäre eine Änderung der Faltung von *TopBP1* vorstellbar, die sich negativ auf die Transaktivierungsaktivität auswirken könnte. Bislang konnte eine direkte Bindung von *TopBP1* an DNA nicht nachgewiesen werden. Lediglich über eine Bindung an DNA-Strangbrüche und -Enden, unabhängig sequenzieller Besonderheiten, wie z.B. Promotoren, wurde von Yamane und Tsuruo berichtet

(Yamane & Tsuruo, 1999). Dies bedeutet aber nicht, dass eine solche direkte Bindung an spezifische DNA-Sequenzen durch TopBP1 nicht möglich wäre.

Hinzukommend wurde über die transkriptionelle Regulation einiger Transkriptionsfaktoren wie E2F1, E2 oder Miz1 berichtet, die die Fähigkeit besitzen, gezielt an Promotorsequenzen binden und so die Expression verschiedener Gene beeinflussen (Liu *et al.*, 2004, Boner *et al.*, 2002), sodass TopBP1 auch als indirekter Regulator agieren könnte.

In jedem Fall aber scheint TopBP1, ob nun direkt oder indirekt, in der Lage zu sein, die Expression bestimmter Gene zu modulieren. Inwiefern TopBP1 dabei als positiver oder negativer Regulator auftritt, ist unklar. Bislang sind in der Literatur vorrangig Beispiele für eine reprimierenden Tätigkeit von TopBP1 zu finden. So fungiert TopBP1 auch im Falle von c-Abl, einem Protein, dass bei der Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie eine wichtige Rolle spielt, als Repressor (Li *et al.*, 2005). Sowohl das mRNA-, als auch das Protein-Level des c-Abl-Proteins waren vermindert.

Y. Wollmann stellte in ihrer Dissertation das Genexpressionslevel in TopBP1-Wildtyp-HeLa-Zellen dem in TopBP1-*knock-down*-Zellen gegenüber. Mittels *microarray*-Experimenten bestimmte sie die Genexpression verschiedener Gene in den verschieden gearteten (normale bzw. TopBP1-*knock-down*-Zellen) Zellen. Dabei konnte eine Vielzahl von Genen bestimmt werden, die unter dem Verlust von TopBP1 in den Zellen herauf- bzw. herunterreguliert wurden. Einige dieser Gene bzw. die durch sie kodierten Proteine wirken bei der Entstehung unterschiedlicher Krebsarten mit. So auch das Protein c-Kit, welches durch das c-Kit-Gen codiert wird und dessen mRNA-Level TopBP1-*knock-down*-Zellen herunterreguliert war (Wollmann, 2005).

Die transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Differenzierung und funktionellen Reifung verschiedener Zellen, wie der Melanozyten (Alexander & Nicola, 1998; Kitamura *et al.*, 1998; Ashman, 1999; Mayer & Green, 1968; Mintz & Russell, 1957). In Abwesenheit seines Liganden SCF (Zsebo *et al.*, 1990), reguliert c-Kit Signaltransduktionswege, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Zelle führen (Huang *et al.*, 1998). c-Kit wirkt nicht nur bei den aufgezählten Prozessen mit, es ist auch bei einigen Tumoren als Protoonkogen bekannt (Furitsu *et al.*, 1993; Kanakura *et al.*, 1994; Sundström *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der *microarray*-Versuche konnte zwar letztendlich eine Aussage über den Anstieg oder das Absinken der Genexpression in den Zellen gegeben werden, ob aber die entsprechenden Proteine tatsächlich verstärkt oder vermindert in den Zellen zu detektieren sind, müssten weitere Experimente zeigen.

So könnte man die intrazelluläre Proteinkonzentration mittels Western blot in TopBP1-*knock-down*-Zellen untersuchen. Solch ein TopBP1-*knock-down* kann beispielsweise mit Hilfe von siRNA (*small interfering* RNA) herbeigeführt werden.

siRNAs sind RNA-Moleküle, die in verschiedenen eukaryontischen Organismen vorkommen. Sie haben eine Länge von 20-25 Nukleotiden. Diese Moleküle wurden *small interfering* RNA oder siRNA genannt, weil sie an andere längere mRNA-Moleküle komplementär binden können. Durch diese Bindung wird die mRNA gespalten und damit die Funktion der mRNA zerstört. Das kodierte Protein kann nicht translatiert werden. Natürlicherweise dienen siRNAs der Abwehr von Virusinfektionen.

Man kann sich die Eigenschaften der siRNAs bei der Bestimmung und Charakterisierung von Genfunktionen zu nutze machen. Durch die gezielte Inaktivierung der entsprechenden Transkripte, welche nach einer Transfektion mit komplementären siRNA-Molekülen eintritt, können Gene und ihre Genprodukte funktionell untersucht werden. Neben dem Herunterregulieren von TopBP1 durch einen *knock-down* besteht die Möglichkeit, eine Überexpression von TopBP1 in humanen Zellen hervorzurufen. Dies kann über Antibiotika-Selektionsvektoren wie pCEP4 (Hygromycin) oder pBABEpuro (Puromycin) erfolgen. Solch ein Vektor besitzt neben anderen Strukturen (z.B. His-tag) ein Antibiotika-Resistenzgen, welches den mit ihm transfizierten Zellen ermöglicht, nach Antibiotika-Gabe zu überleben. Innerhalb dieses Vektors sollte sich außerdem das Wildtyp-TopBP1-Gen befinden. Nach erfolgter Transfektion und anschließender Selektion verbleiben nur die Zellen, die neben dem Antibiotika-Resistenzgen auch das TopBP1-Gen exprimieren und somit eine (zu normalen Zellen) vergleichsweise höhere Proteinkonzentration von TopBP1 präsentieren. Nach erfolgreichem TopBP1-*knock-down* bzw. gelungener Überexpression von TopBP1 könnte man die Konzentrationen der Proteine überprüfen, deren für sie codierenden Gene Targetgene von TopBP1 sein könnten.

Für das oben erwähnte Beispiel des c-Kit-Gens, das in TopBP1-*knock-down*-Zellen herabreguliert wurde, würde man in diesen Zellen eine ebenfalls verringerte c-Kit-Proteinkonzentration und im Weiteren auch eine Beeinflussung des c-Kit-Signaltransduktionsweges und seiner Faktoren erwarten.

Inwieweit TopBP1 in der Lage ist, direkt an die Promotorelemente der regulierten Gene zu binden und welche Elemente dies wären, könnte über ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation) und Promotorstudien erfasst werden.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die Interaktionen von TopBP1 und den Proteinen PARP-1 und Cdc45 eingehend und zeigt, welche Auswirkungen diese Interaktionen auf die zellulären Vorgänge haben. Dadurch bieten sich Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen, die in der Diskussion bereits genannt wurden.

Die Tatsache, dass TopBP1 ein multifunktionelles Signalprotein ist, welches Proteine unter variierenden physiologischen Bedingungen bindet und entlässt, deutet auf weitere, bislang unbekannte Interaktionen hin. Mit Hilfe von Coimmunopräzipitationsexperimenten und GST-*Pull-down*-Versuchen bietet sich die Chance, neue Interaktionspartner von TopBP1 finden.

Zudem hätte man mittels TopBP1-*knock-down* und TopBP1-Überexpression die Möglichkeit, die Beeinflussung der Expression bestimmter Gene durch TopBP1 aufzuklären. Auch die Frage nach der Möglichkeit einer direkten Bindung von TopBP1 an die entsprechenden Gene ließe sich so beantworten und in Folge könnten von TopBP1 gebundene Promotorsequenzen identifiziert werden.

Die Aufklärung momentan noch unbekannter Netzwerke von Proteinen und Signaltransduktionswegen und die Rolle von TopBP1 innerhalb dieser wären dadurch möglich.

5. Zusammenfassung

Die hier präsentierten Ergebnisse liefern einen weiteren Beitrag zum verbesserten Verständnis der vielfältigen Funktionen des multifunktionellen Signalproteins Topoisomerase II β -Bindeprotein 1 (TopBP1).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Proteine TopBP1 und PARP-1 *in vivo* und *in vitro* miteinander interagieren. Die 6. BRCT-Domäne des Proteins TopBP1 war hinreichend für die Interaktion mit PARP-1. Die PARP-1-Region, welche die DNA-Bindedomäne und die Automodifikationsdomäne enthält, genügte für die Bindung an TopBP1. Immunfluoreszenzexperimente zeigten, dass TopBP1 und PARP-1 nukleäre Proteine sind, die in überlappenden Regionen des Zellkerns vorkommen. Aus den Immunfluoreszenzexperimenten und den ADP-Ribosylierungsversuchen ließ sich schließen, dass das Gesamtprotein TopBP1 bzw. die 6. BRCT-Domäne dieses Proteins durch PARP-1 poly(ADP-ribosyl)iert werden. Weiterhin belegten die Experimente sehr deutlich, dass eine Hemmung der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität, die Interaktion von Miz1 und TopBP1 wiederherstellte. Das Vorkommen des Komplexes aus TopBP1, PARP-1 und Miz1 (und gegebenenfalls weiteren Proteinen) und die Auflösung dieses Komplexes unter verschiedenen Bedingungen, wie DNA-Schädigungen, lässt die Frage aufkommen, ob TopBP1 als ein sogenanntes *scaffold* (Rückgrad)-Protein agiert, das Proteine unter variierenden physiologischen Bedingungen bindet bzw. aus ihrer Bindung entlässt.

Auch eine direkte Interaktion von humanem TopBP1 und dem Replikationsfaktor Cdc45 konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Unter Nutzung von TopBP1-Teilkonstrukten wurden die 1. und 2. BRCT-Domänen, sowie die 6. BRCT-Domäne für die funktionelle Interaktion mit Cdc45 eingegrenzt. Die Interaktion der 1. und 2. BRCT-Domänen mit Cdc45 bewirkte das Absinken ihrer transkriptionellen Aktivität in Hefe- und Säuger-Ein-Hybrid-Systemen. Beide Proteine interagierten ausschließlich in der frühen S-Phase des Zellzyklus. In der M-Phase konnte allenfalls eine sehr schwache Interaktion verzeichnet werden. Die Überexpression der 6. BRCT-Domäne führte zu einer verminderten Bindung von Cdc45 ans Chromatin. Die Daten weisen darauf hin, dass humanes TopBP1 eine wesentliche Rolle im Initialstadium der DNA-Replikation durch die Interaktion mit dem Replikationsfaktor Cdc45 und die Ladung dieses Proteins an das Chromatin, also an die Orte der DNA-Replikation, spielt.

In weiteren Studien konnte eine starke Abnahme der Transaktivierungsaktivitäten mutagenisierter TopBP1-BRCT1-2-Konstrukte sowohl in Hefezellen, als auch in Säugerzellen

beobachtet werden. So sank in Hefezellen die transkriptionelle Aktivität der ersten beiden BRCT-Domänen von TopBP1 aufgrund der Mutation Arg309Cys um ca. 45%, in HeLa-Zellen um ca. 25%. Diese Daten zeigen den deutlichen Einfluss der Punktmutation des Basenpaares 1010 auf die Transaktivierungsaktivität der ersten beiden BRCT-Domänen des Proteins TopBP1.

Die Annahme, dass TopBP1 ein multifunktionelles Signalprotein ist, welches Proteine unter variierenden physiologischen Bedingungen bindet und entlässt, lässt weitere, bislang unbekannte Interaktionen vermuten. In weiterführenden Experimenten könnten derzeit unbekannte Netzwerke von Proteinen und Signaltransduktionswegen und die Rolle von TopBP1 innerhalb dieser aufgeklärt werden.

Literaturverzeichnis

- Ame JA, Spenlehauer C, de Murcia G.** (2004). The PARP superfamily. *BioEssays* 26: 882-893.
- Alexander,W.S. Nicola,N.A.** (1998). Hemopoietic growth factor receptor abnormalities in leukemia. *Leuk. Res.* 22, 1097-1111.
- Bae J, Donigian JR, Hsueh AJW.** (2003). Tankyrase 1 interacts with Mcl-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 5195-5204.
- Bauerschmidt, C., Pollok, S., Kremmer, E., Nasheuer, H.P. and Grosse, F.** (2007) Interactions of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex, and DNA polymerases δ and ϵ during S phase. *Genes to Cells* 12, 745-758
- Blow, J.J. and Dutta, A.** (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 476-486
- Boner W, Taylor ER, Tsirimonaki E, Yamane K, Campo MS, Morgan IM.** (2002). A functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/ replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. *J. Biol. Chem.*: 22297-2230
- Bootsma, D.** (1965) Changes induced in the first post-irradiation generation cycle of human cells studies by double labeling. *Exp. Cell Res.* 38, 429-431
- Bouchard VJ, Rouleau M, M., Poirier GG.** (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31: 446-454.
- Breeden, L. and Nasmyth, K.** (1987) Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and transacting regulators. *Cell* 48, 389-397
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-553.
- Callebaut, I. and Mornon, J.P.** (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett.* 400, 25-30
- Cervellera MN, Sala A.** (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J. Biol. Chem.* 275: 10692-10696.
- Chiarugi A.** (2002). Poly(ADP-ribose)polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 122-129.
- Dantzer F, Peter Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Menissier-de Murcia J.** (1998). Functional association of poly(ADP-ribose)polymerase with DNA

- polymerase α -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 26: 1891-1898.
- DeGregori, James** (2004) The Rb network. *Journal of Cell Science* 117, 3411-3413
- Dolan, W.P., Sherman, D.A. and Forsburg, S.L.** (2004) *Schizosaccharomyces pombe* replication protein Cdc45/Sna41 requires Hsk1/Cdc7 and Rad4/Cut5 for chromatinbinding. *Chromosoma* 113, 145-156
- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE, Breast Cancer Linkage Consortium** (1994) Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. *Lancet* 343:692–695 [PubMed].
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, et al** (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 62:676–689 [PubMed].
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y** (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest.* 1993 Oct;92(4):1736-44
- Gagne JP, Hunter JM, Labrecque B, Chabot B, Poirier GG.** (2003). A proteomic approach to the identification of heterogenous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem. J.* 371: 331-340.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D. and Labib, K.** (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature Cell Biol.* 8, 358-366
- Garcia, V., Furuya, K. and Carr, A.M.** (2005) Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair* 4, 1227-1239
- Grana, X., and Reddy, E. P.** (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, 11:211 –219
- Hashimoto, Y., Tsujimura, T., Sugino, A. and Takisawa, H.** (2006) The phosphorylated C-terminal domain of *Xenopus* Cut5 directly mediates ATR-dependent activation of Chk1. *Genes to Cells* 11, 993-1007
- Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottinger MO.** (2003). Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J. Biol. Chem.* 278: 45145-45153.

- Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaoja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M.** (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol. Cell* 10: 509-521.
- Hartwell, L. H. & Weinert, T. A.** (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-34.
- Honda Y, Tojo M, Matsuzaki K, Anan T, Matsumoto M, Ando M, Saya H, Nakao M.** (2002). Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J. Biol. Chem.* 277:3599-3605.
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL.** (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling, *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 259-264.
- Howard, C. M., Claudio, P. P., De Luca, A., Stiegler, P., Jori, F. P., Safdar, N. M., Caputi, M., Khalili, K., and Giordano, A.** (2000) Inducible pRb2/p130 expression and growth-suppressive mechanism: evidence of a pRb2/p130, p27kip1, and cyclin E negative feedback regulatory loop. *Cancer Res.*, 60:2737 –2744
- S Huang, D Jean, M Luca, M A Tainsky, and M Bar-Eli** (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.* 1998 August 3; 17(15): 4358–4369.
- Jeon, Y., Lee, K.Y., Ko, M.J., Lee, Y.S., Kang, S. and Hwang, D.S.** (2007) Human TopBP1 participates in cyclin E/CDK2 activation and pre-initiation complex assembly during G1/S transition. *J. Biol. Chem.* 282, 14882-14890
- Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Butterfield JH, Ashman LK, Ikeda H, Kitayama H, Kanayama Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y.** Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leukemia.* 1994 Apr;8 Suppl 1:S18-22
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA.** (1999). PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* 27: 866-874.
- Karppinen SM, Erkkö H, Reini K, Pospiech H, Heikkinen K, Rapakko K, Syväoja JE, Winqvist R.** (2006). Identification of a common polymorphism in the TopBP1 gene associated with hereditary susceptibility to breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2006 Oct;42(15):2647-52.
- Kim JE, McAvoy SA, Smith DI, Chen J.** (2005). Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase. *Mol. Cell. Biol.* 25: 10907-10915.

- Kitamura,Y., Hirota,S., and Nishida,T.** (1998). Molecular pathology of c-kit proto-oncogene and development of gastrointestinal stromal tumors. *Ann. Chir Gynaecol.* 87, 282-286.
- Kumagai A, Lee J, Yoo H, Dunphy WG.** (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124: 943-955.
- Kukimoto, I., Igaki, H. and Kanda, T.** (1999) Human Cdc45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase α . *Eur. J. Biochem.* 265, 936-943
- Lei, M. and Tye, B.K.** (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J. Cell Science* 114, 1447-1454
- Lees, E.** (1995) Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:773 –780
- Liu, K., Luo, Y., Lin, F.T. and Lin, W.C.** (2004) TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev.* 18, 673-686
- Liu, K., Lin, F.T., Michael Ruppert, J. and Lin, W.C.** (2003) Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3287-3304
- Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, Althaus FR.** (1998). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J. Biol. Chem.* 273: 11839-11843.
- Machida, Y.J., Hamlin, J.L. and Dutta, A.** (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123, 13-24
- Mäkinieni, M., Hillukkala, T., Tuusa, J., Reini, K., Vaara, M., Huang, D., Pospiech, H., Majuri, I., Westerling, T., Mäkelä, T.P. and Syväoja, J.E.** (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J. Biol. Chem.* 276, 30399-30406
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G.** (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18: 3563-3571.
- Mayer,T.C. and Green,M.C.** (1968). An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and S1 loci in mice. *Dev. Biol.* 18, 62-75.
- Mendez, J. and Stillman, B.** (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, Cdc6, and minichromosome maintenance proteins during cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8602-8612

- Mintz, B. and Russell, E.S.** (1957). Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J. Exp. Zool.* 134, 207-237.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W. and Botchan, M.R.** (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10236-10241
- Mumberg, D., Mülle, R. and Funk, M.** (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122
- Pacek, M. and Walter, J.C.** (2004) A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eucaryotic DNA replication. *EMBO J.* 23, 3667-3676
- Niedergang C, Okazaki H, Mandel P.** (1997). Properties of purified calf thymus poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase. *Eur. J. Biochem.* 102: 43-57.
- Oei SL, Shi Y.** (2001). Transcription factor Ying Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 450-454.
- Pacek, M., Tutter, A.V., Kubota, Y., Takisawa, H. and Walter, J.C.** (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol. Cell* 21, 581-587
- Pleschke JM, Kleczkowska HN, Strohm M, Althaus FR.** (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 40974-40980.
- Pollok, S., Stoepel, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E. and Nasheuer, H.P.** (2003) Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem. Soc. T.* 31, 266-269
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. and Dynlacht, B.D.** (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes Dev.* 16, 245-256
- Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J, Trong HL, Hoekstra MF, Chen DJ, Peterson SR.** (1998). Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 273: 14461-14467.
- Shall S, de Murcia G.** (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.* 460: 1-15.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo RB, Samara R, Espinoza LA, Hassa PO, Hottiger MO, Smulson ME.** (2003). PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA

- binding and catalytic domains, and acts as novel coactivator of E2F-1 mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene* 22: 8460-8471.
- Sangrithi, M.N., Bernal, J.A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W.G. & Venkitaraman, A.R.** (2005) Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell* 121, 887-898
- Saha, P., Thome, K.C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Weremowicz, S. and Dutta, A.** (1998) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J. Biol. Chem.* 273, 18205-18209
- Schmidt U., Wollmann Y., Franke C., Grosse F., Saluz HP and Hänel F.** (2008) Characterization of the interaction between the human DNA topoisomerase II β binding protein 1 (TopBP1) and the cell division cycle protein 45 (CDC45). *Biochemical Journal* 2008 Jan 1; 409(1):169-77
- Smulson ME, Simbulan-Rosenthal CM, Boulares AH, Yakovlev A, Stoica B, Iyer S, Luo R, Haddad B, Wang ZQ, Pang T, Jung M, Dritschilo A, Rosenthal DS.** (2000) Roles of poly(ADP-ribosyl)ation and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1. *Adv. Enzyme Regul.* 40: 183-215.
- Sundström M, Vliagoftis H, Karlberg P, Butterfield JH, Nilsson K, Metcalfe DD, Nilsson G.** (2003) Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology.* 2003 Jan;108(1):89-97
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H.** (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328-332
- Usskilat C, Skerka C, Saluz HP, Hänel F.** (2006) The transcription factor Egr-1 is a regulator of the human TopBP1 gene. *Gene* 380(2):144-50. Epub 2006 Jun 8.
- Van den Oord, J.J., Vandeghinste, N., De Ley, M., and Wolf-Peeters, C.** (1994). Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am. J. Pathol.* 145, 294-300.
- Van Hatten, R.A., Tutter, A.V., Holway, A.H., Khederian, A.M., Walter, J.C. and Michael, W.M.** (2002) The *Xenopus* Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication. *J. Cell Biol.* 159, 541-547
- Vincenzo D'Angiolella, Cecilia Mari, Donatella Nocera, Linda Rametti and Domenico Grieco,** (2003) The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes & Dev.* 17: 2520-2525

- Virag L, Szabo C.** (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 54: 375-429.
- Wollmann Y.** (2005). Dissertation: Das Miz1-interagierende Protein TopBP1-Identifizierung neuer Interaktionspartner und Untersuchungen zur Rolle bei der Zellzyklusregulation.
- Wollmann Y.*, Schmidt U.*, Wieland G.D., Zipfel P.F., Saluz HP and Hänel F.** (2007) The DNA Topoisomerase II β Binding Protein 1 (TopBP1) Interacts with Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP-1). *Journal of Cellular Biochemistry* 102:171–182
- Xu ZX, Timanova-Atanasova A, Zhao RX, Chang KS.** (2003). PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol. Cell. Biol.* 23: 4247-4256.
- Yamane. K., Wu, X. and Chen, J.** (2002) A DNA damage-regulated BRCT-containing protein. TopBP1, is required for cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 22, 555-566
- Yamane, K., Chen, J. and Kinsella, T.J.** (2003) Both DNA topoisomerase II-binding protein 1 and BRCA1 regulate the G2-M cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 63, 3049-3053
- Yamane, K., Kawabata, M. and Tsuruo, T.** (1997) A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur. J. Biochem.* 250, 794-799
- Yan, S., Lindsay, H.D. and Matthew Michael, W.** (2006) Direct requirement for Xmus101 in ATR-mediated phosphorylation of Claspin bound Chk1 during checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* 173, 181-186
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Dunphy, W.G.** (2007) ATM-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. *J. Biol. Chem.* 282, 17501-17506
- Yung TMC, Sato S, Satoh MS.** (2004). Poly(ADP-ribosyl)ation as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose) polymerase-1-topoisomerase I interaction. *J. Biol. Chem.* 279: 39686-39696.
- Zheng, C.F. and Guan, K.L.** (1994) Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J. Biol. Chem.* 269, 19947-19952
- Yabuuchi, H., Yamada, Y., Uchida, T., Sunathvanichkul, T., Nakagawa, T. and Masukata, H.** (2006) Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 for activation of replication origins. *EMBO J.* 25, 4663-4674
- Zegerman, P. and Diffley, F.X.** (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281-285

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Uta Schmidt, geb. am 21.03.1975 in Erfurt,
dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich Dr. Frank Hänel bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 24.04.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. -Hans-Knöll-Institut in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Saluz danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Dissertation anzufertigen. Seine Unterstützung war mir, ebenso wie die wissenschaftlichen Anregungen, eine große Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Hänel, der mich jederzeit unterstützte und ermutigte. Seine fachliche Hilfe im Rahmen der Arbeit, verbunden mit vielen anregenden Diskussionen hat mir auch in schwierigen Situationen stets weitergeholfen.

Claudia Franke danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, ihre technische Unterstützung und ihren Rat in allen Lebenslagen.

Für die freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich weiterhin bei Annemarie Carlstedt, Nicole Borth, Grit Mrotzek, Jürgen Lassak, Gerhard Wieland, Andrea Hartmann, Kathrin Landgraf (FLI, Jena) und Swetlana Bauer, sowie allen bislang nicht erwähnten Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Molekularbiologie bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Große und Sibyll Pollok (FLI, Jena) bedanke ich mich herzlich für die kooperative Zusammenarbeit auf dem Gebiet der DNA-Replikation.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Freunden und meiner Familie für die Ermutigung und Unterstützung bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern und meiner Großmutter, die mich über die Jahre hinweg immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich aufrichtig meinem Lebenspartner Andreas Palinske, der die Höhen und Tiefen des täglichen Lebens mit mir teilte und mir in vielen Situationen durch Gespräche weiterhalf.